

Charakterisierung von Komponenten der Signaltransduktion zwischen  
Zellen: die X-chromosomalen Gene *trol* und *tao*  
von *Drosophila melanogaster*

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
Dissertation

von Aaron Voigt  
aus Hannover

1. Referent: Prof. Jahn

2. Referent: Prof. Jäckle

eingereicht am: 21.07.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 1.11.2005

2006 (Druckjahr)



## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U., Jäckle, H.  
Perlecan Participates in Proliferation Activation of Quiescent *Drosophila* Neuroblasts. *Developmental Dynamics* 224: 403-412 (2002)

### Tagungsbeiträge:

Voigt, A., Pflanz, R., Jäckle, H.  
Neuroblast proliferation in *Drosophila* requires Perlecan. (Poster)  
International Congress on Differentiation and Cell Biology  
Broadbeach, Australia (2000)

Voigt, A., Pflanz, R., Jäckle, H.  
Neuroblast proliferation in *Drosophila* requires Perlecan. (Vortrag)  
8<sup>th</sup> Regional *Drosophila* Meeting  
Würzburg, Deutschland (2001)

Voigt, A., Pflanz, R., Jäckle, H.  
Neuroblast proliferation in *Drosophila* requires Perlecan. (Poster)  
43<sup>rd</sup> Annual *Drosophila* Research Conference  
San Diego, California (2001)

Voigt, A., Jäckle, H.  
Multiple functions of Perlecan during *Drosophila* development. (Vortrag)  
Doktoranden Seminar des MPI bpC  
Göttingen, Deutschland (2002)

Voigt, A., Pflanz, R., Jäckle, H.  
Neuroblast proliferation in *Drosophila* requires Perlecan. (Poster, Vortrag)  
4. GfE School: Novel Approaches to Developmental Biology.  
Günzburg, Deutschland (2002)

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1-18</b>
1.1 Spezifikation der Neuroblasten, den Stammzellen des Nervensystems.	2
1.2 Die Bildung des adulten Nervensystems beginnt schon während der larvalen Stadien .....	3
1.3 <i>trol</i> ist an der Regulation der Proliferation von Neuroblasten beteiligt ....	6
1.4 Die achte Unterfamilie der “Germinal Center Kinases” .....	10
1.5 Der MAPK-Signaltransduktionsweg .....	11
1.6 Die Funktion von Mitgliedern der GCK-VIII Unterfamilie im MAPK-Signaltransduktionsweg .....	14
1.7 MARK/Par1 sind an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt und werden von Tao1 aktiviert .....	16
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>19-57</b>
2.1 Identifikation neuer Allele des <i>trol</i> -Gens .....	19
2.2 Charakterisierung des Phänotyps <i>trol</i> -mutanter Individuen .....	20
2.3 Identifikation der von <i>trol</i> codierten Transkriptionseinheit .....	23
2.4 <i>trol</i> codiert für <i>Drosophila</i> -Perlecan .....	25
2.5 Expression von <i>trol</i> .....	29
2.6 Deletion des <i>trol</i> -Lokus und die Erzeugung von Keimbahnklonen .....	33
2.7 Identifikation von Tao, dem einzigen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie in <i>Drosophila</i> .....	36
2.8 Der <i>tao</i> -Lokus .....	38
2.9 Charakterisierung ausgewählter <i>tao</i> -Allele .....	39
2.10 Erzeugung von Deletionsmutanten des <i>tao</i> -Lokus .....	40
2.11 Revertierung des letalen Phänotyps <i>tao</i> -mutanter Individuen durch eine transgen-abhängige Duplikation des <i>tao</i> -Lokus .....	42
2.12 Expression von <i>tao</i> .....	43
2.13 Phänotypische Analyse des <i>tao<sup>ts</sup></i> -Allels .....	46
2.14 “Gain of function”-Analysen .....	48
2.15 Genetische Interaktion zwischen Tao und dem JNK-Signaltransduktionsweg .....	51
2.16 Tao im p38-Signaltransduktionsweg .....	53
2.17 Genetische Interaktion von Tao und Par1 .....	54

2.18 Genetische Interaktion zwischen Tau und Tao.....	54
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>58-74</b>
3.1 <i>trol</i> codiert <i>Drosophila</i> -Perlecan .....	58
3.2 Perlecan sind an der Regulation von Signaltransduktionsprozessen beteiligt.....	59
3.3 HSPG und Signaltransduktion bei <i>Drosophila</i> .....	60
3.4 Genetische Daten zur Regulation der Proliferation von Neuroblasten der optischen Loben .....	62
3.5 Die achte GCK-Unterfamilie der Vertebraten und <i>Drosophila</i> .....	66
3.6 Phänotypische Analyse <i>tao</i> -mutanter Individuen .....	68
3.7 Regulation des MAPK-Signaltransduktionswegs durch Tao.....	69
3.8 Tao und Neurodegeneration .....	71
<b>4. Materialien und Methoden.....</b>	<b>75-94</b>
4.1 Molekularbiologische Methoden .....	75
4.2 Histologische Methoden .....	78
4.3 Biochemische Methoden .....	84
4.4 Fliegen-genetik .....	84
4.5 <i>In silico</i> -Analysen und Software .....	93
4.6 Puffer und Lösungen .....	94
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>95-96</b>
<b>6. Referenzen.....</b>	<b>97-108</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>109</b>

## 1. Einleitung

Ein Organismus besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen. Während der Entwicklung entstehen alle Zellen, welche sich zum funktionalen Ganzen des Organismus zusammenfügen, aus einer einzigen Zelle, dem befruchteten Ei (Gilbert, 1997). Die funktionelle Diversität der verschiedenen Zelltypen wird durch die Aktivierung spezifischer Gene des allen Zellen gemeinsamen Genoms determiniert. Diese selektive Expression von Genen der verschiedenen Zellen kontrolliert die essentiellen Prozesse, die zur Bildung eines Organismus nötig sind (Gilbert, 1997). Einer dieser Prozesse ist die Zellproliferation, welche gewährleistet, daß aus dem befruchteten Ei alle Zellen des Organismus generiert werden (Gilbert, 1997). Ein weiterer wichtiger Prozeß ist die Zellspezifikation, die Zellen spezifischen Charakters zum richtigen Zeitpunkt an unterschiedlichen Stellen des Organismus hervorbringt. Dabei gewährleisten Zell-Zell-Interaktionen, daß zwischen benachbarten Zellen eine Kommunikation möglich ist. Diese Kommunikation wird von Zellen einer scheinbar homogenen Zellschicht zur Koordination unterschiedlicher Spezifizierungsleistungen genutzt (Gilbert, 1997). Die Zellbewegung schließlich erlaubt es Zellen, sich neu zu organisieren und somit die Organe und Gewebe eines Organismus zu bilden (Gilbert, 1997).

Die Bildung des zentralen Nervensystems (ZNS) von *Drosophila melanogaster*, im folgenden verkürzt *Drosophila* genannt, mit seinen verschiedenen Zelltypen (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984) kann als ein Beispiel für diese Prozesse dienen und steht im Mittelpunkt des ersten Teils dieser Arbeit.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Signaltransduktionswege beschrieben, die an einer Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind. Die Regulation dieser Signaltransduktionswege durch eine näher zu charakterisierende Kinase steht dabei im Vordergrund. Auch für die im zweiten Teil dieser Arbeit beschriebenen Versuche wird das ZNS von *Drosophila* als Modellsystem genutzt.

## **1.1 Spezifikation der Neuroblasten, den Stammzellen des Nervensystems**

Das larvale ZNS von *Drosophila* wird während der Embryogenese von neuronalen Stammzellen, den Neuroblasten, gebildet. Die Neuroblasten sind Derivate des ventral gelegenen Neuro-Ektoderms (Hartenstein and Campos-Ortega, 1985). Die Zellen des ventralen Neuro-Ektoderms erhalten durch die Expression von proneuralen Genen (*achaete-scute* Komplex, *daughterless* etc.) die Potenz, sich zu Neuroblasten zu entwickeln (Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1989; Ghysen and Dambly-Chaudiere, 1990; Cronmiller et al., 1988). Von den etwa 1800 Zellen des Neuro-Ektoderms entwickeln sich jedoch nur ca. 450 zu Neuroblasten, die restlichen Zellen werden zu Epidermoblasten, den Vorläuferzellen der Epidermis (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984; Hartenstein and Campos-Ortega, 1985).

Die Spezifikation der Neuroblasten wird durch laterale Inhibition erreicht (Skeath and Thor, 2003; Rooke and Xu, 1998; Muskavitch, 1994). An diesem Prozeß sind die Transmembranproteine Notch und Delta beteiligt (Welshons, 1965; Johansen et al., 1989; Kidd et al., 1989; Alton et al., 1988). Die Zellen des Neuro-Ektoderms exprimieren sowohl den Liganden Delta als auch den Rezeptor Notch. Bindet Delta an Notch, so hat dies inhibitorische Wirkung in bezug auf die neurogene Potenz der Notch-exprimierenden Zelle, da die Expression der proneuronalen Gene supprimiert wird (Skeath and Thor, 2003). Somit inhibieren sich alle Zellen des Neuro-Ektoderms anfänglich gegenseitig. Gleichzeitig hat die Aktivierung von Notch durch Delta auch eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von Delta. So entsteht eine Konkurrenz zwischen den Zellen des Neuro-Ektoderms: Diejenige Zelle, die am stärksten Delta exprimiert, supprimiert somit die Expression von Delta der Nachbarzellen. Aufgrund dieser Suppression inhibiert diese Zelle die neuronale Kompetenz aller Nachbarzellen, empfängt aber von diesen kein inhibitorisches Delta-Signal mehr und wird dadurch zum Neuroblasten (Skeath and Thor, 2003; Rooke and Xu, 1998; Muskavitch, 1994).

Je nach Lage werden die entstehenden Neuroblasten dem ventralen Neuro-Ektoderm (VNE) und dem proencephalen Neuro-Ektoderm (PNE) zugeordnet (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984). Aus den Neuroblasten des VNE geht später der ventrale Nervenstrang und das subösophageale Ganglion hervor, während die Neuroblasten des PNE die Hemisphären des Gehirns bilden (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984; Stüttem and Campos-Ortega, 1991). Die meisten Neuroblasten proliferieren asymmetrisch. Aus jeder Teilung geht wiederum ein Neuroblast und eine kleinere Ganglionmutterzelle (GMZ) hervor (Bate, 1976). Das zeitliche und räumliche Teilungsmuster der Neuroblasten des VNE ist hochgradig stereotyp. Für jedes Hemisegment mit seinen ca. 25 Neuroblasten können somit die entstandenen GMZ eindeutig einem Neuroblasten zugeordnet werden (Udolph et al., 1993; Doe and Technau, 1993). Die aus der asymmetrischen Teilung hervorgegangenen GMZ teilen sich noch einmal, und die Tochterzellen differenzieren sich zu postmitotischen Neuronen (Spana et al., 1995; Doe and Technau, 1993). Die Neuroblasten eines Hemisegments generieren etwa 200 embryonale Neuronen. Diese bilden schließlich zusammen mit den Gliazellen, d.h. Derivaten von Zellen der Mittellinie und der epidermalen Glioblasten, das Nervensystem des Embryos und später das der Larve (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984; Klämbt et al., 1991).

### **1.2 Die Bildung des adulten Nervensystems beginnt schon während der larvalen Stadien**

Das larvale Nervensystem bleibt während der drei larvalen Stadien im Wesentlichen unverändert. Aufgrund der Lebensweise der Larve in einer semiliquiden Umgebung unterscheidet sich das Nervensystem drastisch von dem der adulten Fliege. Die adulte Fliege besitzt im Gegensatz zur Larve ein wesentlich größeres Repertoire an sensorischen Strukturen wie z.B. die Komplexaugen und Antennen. Desweiteren sind auch die motorischen Fähigkeiten durch Beine und den Flugapparat deutlich stärker ausgebildet als dies in den larvalen Stadien der Fall ist.

Diese zusätzlichen Differenzierungsleistungen setzen eine Neuorganisation des larvalen Nervensystems beim Übergang von den larvalen Stadien zum adulten Tier voraus, die während der Metamorphose stattfindet. Während der Metamorphose werden fast alle larvalen Strukturen degeneriert und, die adulten Strukturen aus den sogenannten Imaginalscheiben, die während der larvalen Stadien gebildet werden, neu generiert (Tissot and Stocker, 2000). Die meisten larvalen Neuronen bleiben jedoch erhalten, daher müssen neu entstehende adulte neuronale Strukturen mit dem bestehenden larvalen Nervensystem verbunden werden. Die adulten neuronalen Strukturen entstehen ebenfalls aus Neuroblasten, welche schon während der Embryogenese angelegt wurden, jedoch nicht zur Bildung des larvalen Nervensystems beitragen. Wie alle holometabolen Insekten mit vollständiger Metamorphose, hat auch *Drosophila* zwei neurogene Phasen: Die erste während der Embryogenese (Hartenstein and Campos-Ortega, 1984), die zweite während der larvalen Stadien (White and Kankel, 1978; Truman and Bate, 1988).

Eine solche zweiphasige Aufteilung der Neurogenese macht es erforderlich, daß einige während der Embryogenese determinierte Neuroblasten als Stammzellen erhalten bleiben (Prokop and Technau, 1991). Diese proliferieren oder/und differenzieren sich in ortsspezifischer Weise zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung (White and Kankel, 1978; Truman and Bate, 1988). Diese Neuroblasten bleiben zunächst als pluripotente Stammzellen erhalten und können im weiteren Verlauf der Entwicklung reaktiviert werden. Nach Reaktivierung nehmen sie dann die Proliferationsaktivität wieder auf, oder sie beginnen sich zu differenzieren (White and Kankel, 1978; Truman and Bate, 1988). Das Nervensystem von *Drosophila* stellt somit ein experimentelles System dar, an dem die genetischen und molekularen Grundlagen der Regulation von neuronalen Stammzellen in bezug auf Differenzierung und Proliferation untersucht werden können.

Im embryonalen und larvalen Gehirn können drei Populationen von Neuroblasten unterschieden werden, welche unterschiedliche

Proliferationsprofile aufweisen (s. Abb. 1.1). Dabei handelt es sich um die Neuroblasten der optischen Loben, des Thoraxes und des Pilzkörpers (Truman and Bate, 1988).

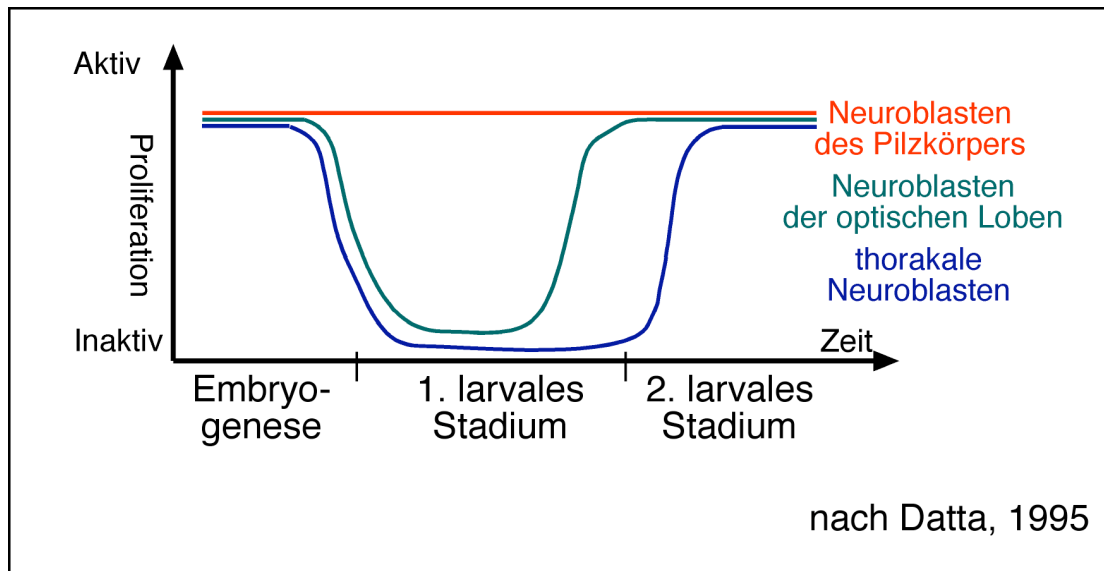


Abbildung 1.1: Neuroblasten des larvalen Gehirns und ihre Proliferationsprofile

Gezeigt sind die Proliferationsprofile von drei Neuroblastenpopulationen während der embryonalen und larvalen Entwicklung des Gehirns. Die Neuroblasten des Pilzkörpers (rot) beginnen während der späten Embryogenese mit der Proliferation und stellen diese im frühen pupalen Stadium ein (Truman and Bate, 1988; Ito and Hotta, 1992). Die Neuroblasten der optischen Loben (grün) und des Thoraxes (blau) beginnen während der frühen Embryogenese mit der Proliferation, hören jedoch gegen Ende der Embryogenese auf zu proliferieren. Eine Wiederaufnahme der Proliferationsaktivität von Neuroblasten der optischen Loben beginnt 12-15 Stunden nach dem Schlüpfen der Larve (White and Kankel, 1978; Hartenstein and Campos-Ortega, 1985; Truman and Bate, 1988). Die thorakalen Neuroblasten hingegen zeigen erst ca. 28 Stunden nach dem Schlüpfen der Larve wieder Proliferationsaktivität (Ito and Hotta, 1992; Datta, 1995).

Der Pilzkörper geht aus nur vier Neuroblasten hervor. Diese beginnen erst während der späten Embryogenese mit der Proliferation. Sie erfolgt dann kontinuierlich während der larvalen Stadien (Ito and Hotta, 1992). Im Gegensatz dazu proliferieren die Neuroblasten der optischen Loben und des Thoraxes bereits während der frühen Embryogenese (Truman and Bate, 1988; Hartenstein and Campos-Ortega, 1985). Gegen Ende der Embryogenese stellen diese beiden Neuroblastenpopulationen ihre Proliferationsaktivität allerdings wieder ein, und verbleiben als proliferativ



inaktive Neuroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert (Datta, 1995). Während die Neuroblasten der optischen Loben im ersten larvalen Stadium ihre Proliferationsaktivität wieder aufnehmen, beginnen die thorakalen Neuroblasten erst zu Beginn des zweiten larvalen Stadiums mit der erneuten Proliferation (White and Kankel, 1978; Hartenstein and Campos-Ortega, 1985; Truman and Bate, 1988; Prokop and Technau, 1991; Green et al., 1993; Datta, 1995). Die thorakalen Neuroblasten sowie die der optischen Loben weisen somit eine zeitliche Regulation der Proliferation auf. Das spezifische Proliferationsprofil dieser Neuroblastenpopulationen kann somit in fünf Phasen unterteilt werden: Aktivierung der Proliferation, Aufrechterhalten der Proliferationsaktivität, Repression der Proliferation, Aufrechterhalten der Repression und letztlich das Reaktivieren der Proliferation.

### **1.3 *troI* ist an der Regulation der Proliferation von Neuroblasten beteiligt**

Einige Gene, die an der Regulation der Proliferation von Neuroblasten beteiligt sind, konnten bereits identifiziert werden. Dabei handelt es sich unter anderem um *anachronism* (*ana*), *terribly reduced optic lobes* (*troI*) und *even-skipped* (*eve*) (Lipshitz and Kankel, 1985; Datta and Kankel, 1992; Ebens et al., 1993; Prokop and Technau, 1994; Park et al., 1998; Guan et al., 2000).

Wie anhand der Arbeit von Zipursky und Mitarbeitern (Ebens et al., 1993) gezeigt werden konnte, ist Ana ein von Gliazellen sekretiertes Glykoprotein. In *ana*-mutanten Individuen beginnen sowohl die Neuroblasten der optischen Loben als auch die thorakalen Neuroblasten verfrüht mit der Proliferation. Die Initiation des Proliferationsarrests der beiden Neuroblastenpopulationen ist in *ana*-mutanten Individuen jedoch nicht beeinträchtigt (Ebens et al., 1993). Auch auf die kontinuierlich proliferierenden Neuroblasten des Pilzkörpers haben *ana*-Mutationen keinen Effekt. Weder die Anzahl der thorakalen Neuroblasten noch deren Teilung sind in *ana*-mutanten Individuen betroffen (Ebens et al., 1993). Daher ist davon auszugehen, daß Ana nur an der Aufrechterhaltung des Proliferationsarrests beteiligt und nicht für dessen Initiation verantwortlich ist (Ebens et al., 1993).

Interessanterweise korreliert die Reaktivierung der Proliferation der beiden Neuroblastenpopulationen nicht mit einer Reduktion von *ana*-Transkripten oder des Proteins (Ebens et al., 1993). Dies legt die Vermutung nahe, daß die durch *ana* vermittelte Repression der Proliferation außer Kraft gesetzt oder zumindest stark reduziert werden muß. Dies könnte sowohl durch eine zellautonome Regulation geschehen, als auch durch äußerliche Einflüsse initiiert werden (Datta, 1995).

Es wurde jedoch gezeigt, daß die durch Ana vermittelte Repression der Neuroblastenproliferation durch das von dem *troI*-Lokus codierte Genprodukt aufgehoben werden kann (Datta, 1995). Der für die *troI*-Mutation namensgebende und charakteristische Phänotyp ist eine Reduktion der optischen Loben der Gehirne *troI*-mutanter Larven (Datta and Kankel, 1992). Die Reduktion der optischen Loben ist dabei auf eine fehlende Reaktivierung der im Zellzyklus arretierten Neuroblasten der optischen Loben zurückzuführen (Datta, 1995). Die fehlende Reaktivierung der in der G1-Phase des Zellzyklus arretierten Neuroblasten in *troI*-Mutanten ist jedoch bei Abwesenheit von *ana* nicht zu beobachten (Datta, 1995). In Doppelmutanten für *troI* und *ana* ist eine unerwartete verfrühte Proliferationsaktivität dieser Neuroblastenpopulationen zu erkennen, was darauf hindeutet, daß die Aktivität von *troI* für die Reaktivierung des von Ana-vermittelten Proliferationsarrests nötig ist.

Der von *eve* codierte Homeodomänen-Transkriptionsfaktor bestimmt in vielen Fällen das Entwicklungsschicksal von Zellen. Eve hat eine Paarregel-Aktivität, welche für die Etablierung der Segmentierung des Embryos notwendig ist (MacDonald et al., 1986). Desweiteren ist Eve an der Determinierung neuronaler Zellidentität während der Embryogenese beteiligt. In beiden Prozessen ist Eve Teil einer zellautonomen Kaskade von Transkriptionsfaktoren (Akam, 1987). Andere Studien (Liang and Biggin, 1998) deuten darauf hin, daß Eve nicht nur an der Determinierung von Zellidentität während der Embryogenese beteiligt ist. Vielmehr kontrolliert Eve auch direkt oder indirekt die Transkription von Genen wie *adh* (*alcohol*

*dehydrogenase*) oder *ry* (*rosy*) und ist somit als allgemeiner Transkriptionsfaktor anzusehen (Liang and Biggin, 1998).

Wie anhand der Arbeiten von Datta und Mitarbeitern (Park et al., 1998) gezeigt werden konnte, verstärken *eve*-Mutationen den Phänotyp des schwachen *troI*-Alleles *troI<sup>p22</sup>*. Da *eve* nicht in den regulierten Neuroblasten exprimiert wird, ist davon auszugehen, daß Eve an der Produktion eines diffundierbaren Transaktivator-Signals beteiligt ist, welches die Proliferation der Neuroblasten stimuliert. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die durch Mutation von *eve* hervorgerufene Verstärkung des *troI<sup>p22</sup>* Phänotyps durch das Hormon Ecdyson wieder normalisiert werden kann. Im Gegensatz zu diesen Befunden kann der durch *troI<sup>p22</sup>* hervorgerufene Phänotyp nicht durch eine erhöhte Konzentrationen an Ecdyson normalisiert werden. Aus diesen Daten kann eine Regulationskaskade vermutet werden, die zur Neuroblastenproliferation in der Anlage der optischen Loben führt. In dieser Kaskade ist das Hormon Ecdyson unterhalb der Eve-Aktivität und oberhalb der *TroI*-Aktivität anzusiedeln (Park et al., 2001).

Wie anhand der Analyse von *troI*-Mutanten gezeigt werden konnte, ist *troI* ein essentieller Faktor, der an der Regulation der Proliferation von neuronalen Stammzellen beteiligt ist, die zur Ausbildung der optischen Loben während der frühen Larvalentwicklung führen. Die molekulare Identität des *troI*-Gens war jedoch bisher unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transkriptionseinheit von *troI* identifiziert, und das Genprodukt charakterisiert. Das *troI*-Protein weist Homologie zu Perlecanen der Vertebraten auf. Perlecan ist ein Protein der extrazellulären Matrix. In Vertebraten sind Perlecanen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Domänen, sowie durch eine Verknüpfung mit Heparansulfat (HS)-Seitenketten charakterisiert (Hassel et al., 1980; Noonan et al., 1991; Danielson et al., 1992). Die Eigenschaft von Perlecan, Liganden zu binden, zu speichern oder gebundene Liganden wieder freizusetzen (Noonan et al., 1991; Aviezer et al., 1994; Handler et al., 1997), steht mit der postulierten Funktion der von *troI* codierten Transkriptionseinheit durchaus im Einklang.

Ferner wird die Erzeugung neuer Allele des *troI*-Gens und deren phänotypische Charakterisierung beschrieben. Es wird darüber hinaus gezeigt, daß die Nullmutation des Perlecan-homologen Gens zu einem charakteristischen *troI*-mutanten Phänotyp führt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Funktion einer Kinase beschrieben, welche die Phosphorylierung der Hydroxyaminosäure Serin und Threonin innerhalb von Proteinen katalysiert. Durch die Phosphorylierung bestimmter Serin- und/oder Threonin-Reste eines Proteins kann dessen Funktion reguliert werden (Gilbert, 1997). Die durch Phosphorylierungen von Proteinen regulierten Mechanismen sind vielfältig und reichen von der Aktivierung bestimmter Kinasen bis zur Regulation von Bindungsaffinitäten (Gilbert, 1997).

Bei der in dieser Arbeit analysierten Kinase handelt es sich um ein Mitglied der Ste20-ähnlichen Kinasen, einer Gruppe von Kinasen die nach dem "sterile 20 protein" (Ste20p) aus *Saccharomyces cerevisiae* benannt wurde (Wu et al., 1995). In Hefe ist Ste20p als eine essentielle Komponente des Signaltransduktionswegs identifiziert worden, der die sexuelle Vermehrung haploider Zellen aktiviert (Wu et al., 1995; Drogen et al., 2000). Dieser Signaltransduktionsweg beginnt mit der Bindung eines Pheromons an seinen Rezeptor. Durch die Bindung des Pheromons wird eine Aktivierung des "Mitogen-activated protein kinase" (MAPK)-Signaltransduktionswegs durch ein heterotrimäres G-Protein vermittelt (s. Abb. 1.2) (Wu et al., 1995; Drogen et al., 2000).

### 1.4 Die achte Unterfamilie der "Germinal Center Kinases"

Bei Vertebraten können die Ste20p-ähnlichen Kinasen in zwei Familien unterteilt werden: die "p21 Activated Kinases" (PAK) und die "Germinal Center Kinases" (GCK), die aufgrund der Position der Kinasedomäne unterschieden werden können (Dan et al., 2001). Die PAK zeichnen sich durch eine C-terminale Lokalisation der Kinasedomäne aus, bei den GCK hingegen ist die Kinasedomäne N-terminal lokalisiert. Während die PAK in zwei Unterfamilien unterteilt sind, können bei den GCK acht Unterfamilien unterschieden werden (Terminologie und Phylogenie nach Dan et al., 2001). Die achte Unterfamilie der GCK umfaßt bei Vertebraten drei Mitglieder. Je zwei der drei GCK sind beim Mensch und der Ratte näher charakterisiert. Hierbei handelt es sich um

die “Thousand And One”-Kinase 1 (Tao1), die “Thousand And One”-Kinase 2 (Tao2) aus *Rattus norvegicus* (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999), sowie die humanen “prostate-derived STE20-like Kinase” (PSK) und “JNK/SAPK-Inhibitory Kinase” (JIK) (Tassi et al., 1999; Moore et al., 2000). Im Fall von Tao2 und PSK handelt es sich um homologe Proteine. JIK und Tao1 hingegen stellen zwei unterschiedliche Vertreter der achten GCK-Unterfamilie dar (s. Tab. 1). Folgt man der Nomenklatur der Tao-Kinasen der Ratte, so handelt es sich bei PSK um die humane Tao-Kinase 2, bei JIK um die Tao-Kinase 3.

<div>Kinase</div> <div>Spezies</div>	Tao-Kinase 1	Tao-Kinase 2	Tao-Kinase 3
<i>Homo sapiens</i>	NP_065842	PSK	JIK
<i>Rattus norvegicus</i>	Tao1	Tao2	XP_222216

Tabelle 1: Übersicht über die einzelnen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie aus *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*

Der achten GCK-Unterfamilie werden in Vertebraten drei Proteine zugeordnet. Folgt man bei der Benennung dieser Kinasen der Nomenklatur aus *Rattus norvegicus* (Tao-Kinase 1-3), so können zu den humanen Kinasen (NP\_065842, PSK und JIK) die folgenden orthologen Kinasen aus *R. norvegicus* zugeordnet werden: Tao1, Tao2 und XP\_222216.

Anhand von *in vitro*-Untersuchungen und Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß sowohl Tao1, Tao2/PSK und JIK eine Funktion im MAPK-Signaltransduktionsweg einnehmen (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Tassi et al., 1999; Moore et al., 2000). Somit konnte für die Tao-Kinasen 1-3 aus Vertebraten eine Funktion im MAPK-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich gemacht werden.

### 1.5 Der MAPK-Signaltransduktionsweg

Der MAPK-Signaltransduktionsweg ist evolutiv konserviert und in allen eukaryotischen Zellen zu finden (Widmann et al., 1999). Allen MAPK-Signaltransduktionswegen ist ein Modul aus drei funktionell und strukturell

verwandten Kinasen gemein. Die MAPK nehmen dabei die letzte Position eines dreistufigen Moduls ein (s. Abb. 1.2).

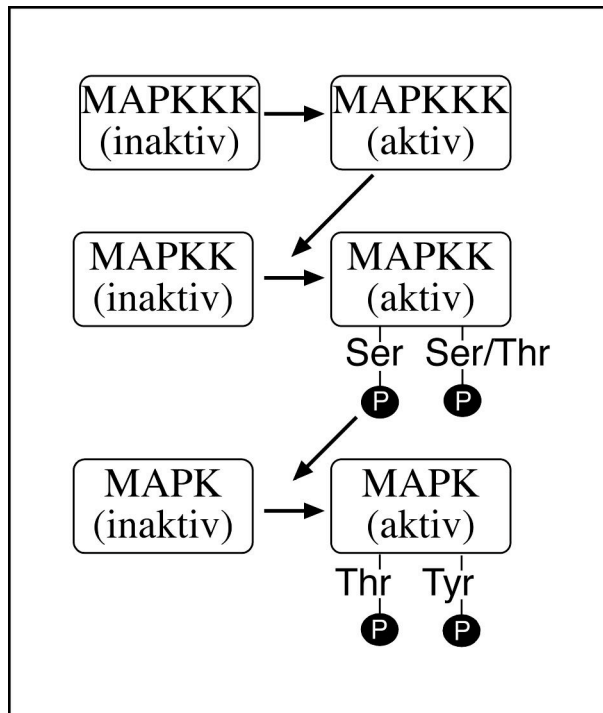


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Aktivierung der drei Kinasen des MAPK-Moduls. Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch die Phosphorylierung von Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) innerhalb eines konservierten Thr-X-Tyr-Motivs. Dieses Motiv im "Aktivierungsloop" der MAPK wird von den MAPKK phosphoryliert. Eine Aktivierung der MAPKK erfolgt durch die MAPKKK. Die MAPKKK phosphorylieren die MAPKK ebenfalls an zwei Aminosäureresten: an Serin (Ser) und wahlweise Ser oder Thr. Auch im Fall der MAPKK befinden sich diese beiden Aminosäurereste innerhalb eines konservierten Motivs. An der Regulation der MAPKKK-Aktivität sind unterschiedliche Prozesse beteiligt: die Rekrutierung der MAPKKK an die Zellmembran, die Homooligomerisation der MAPKKK und schließlich die Phosphorylierung durch hierarchisch höher anzusiedelnde Kinasen.

Sie werden durch die Phosphorylierung von zwei Aminosäuren in einem konservierten Sequenzmotiv aktiviert. Die dafür notwendige Phosphorylierung erfolgt durch die MAPK-Kinasen (MAPKK). Diese wiederum werden von den MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) phosphoryliert und somit aktiviert (Chang and Karin, 2001; Brunet and Pouyssegur, 1997). Die zellulären Prozesse, die durch MAPK reguliert werden, sind von den involvierten Kinasen abhängig. Eine Beteiligung der MAPK-Signaltransduktionswege an den verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung,

Zellbewegung und Apoptose ist beschrieben (Salvesen and Dixit, 1997; Kyriakis and Avruch 2001).

Bei Vertebraten werden hauptsächlich drei MAPK-Signaltransduktionswege unterschieden, die nach unterschiedlichen MAPK benannt sind (s. Abb. 1.3). Hierbei handelt es sich um die Signaltransduktionswege der “extracellular signal-regulated kinases” (ERK), die “c-Jun N-terminal kinases” (JNK) und die p38 Kinasen (p38) (Davis, 1994; Kyriakis and Avruch, 2001).

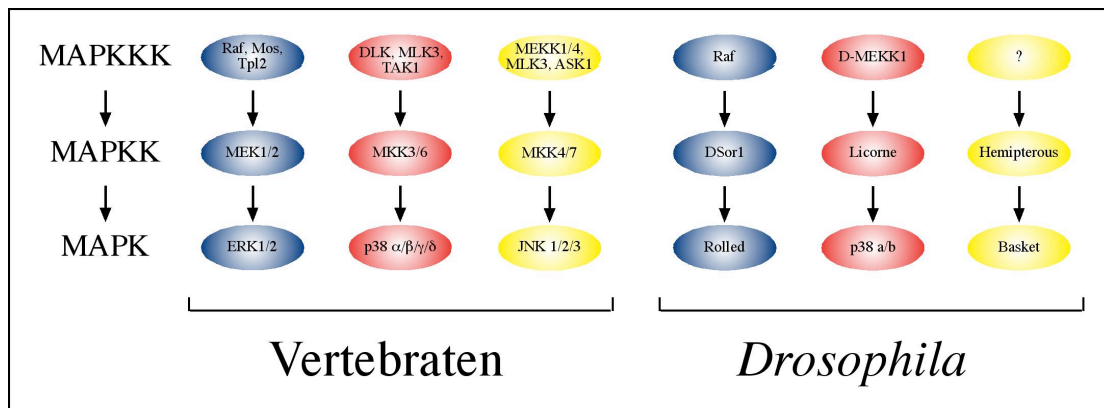


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der MAPK-Signaltransduktionswege von Vertebraten und *Drosophila*

Blau dargestellt ist der ERK-, rot der p38- und gelb der JNK-Signaltransduktionsweg. Die Namen der einzelnen Vertreter der jeweiligen Kinasefamilie sind angegeben. Direkte Interaktionen einzelner Kinasen sind durch Pfeile dargestellt. Bei den hier gezeigten Interaktionen handelt es sich um Phosphorylierungen, welche zur Aktivierung der hierarchisch untergeordneten Kinase führen. Der ERK-Signaltransduktionsweg ist hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Da in Vertebraten für die Mitglieder der achten GCK-Unterfamilie keine Funktion im ERK-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich gemacht werden konnte, wird im weiteren Verlauf nicht näher auf diesen Signaltransduktionsweg eingegangen.

Im Vergleich der einzelnen MAPK-Signaltransduktionswege von Vertebraten und *Drosophila* fällt auf, daß bei Vertebraten mehr Proteine an den jeweiligen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. So sind z.B. bei Vertebraten drei JNKs bekannt (JNK1-3), während *Drosophila* nur ein orthologes Protein, Basket (Bsk), codiert. Gleiches gilt für den p38-Signaltransduktionsweg. In Vertebraten sind vier p38-MAPK beschrieben (p38 $\alpha$  - p38 $\delta$ ), in *Drosophila* hingegen nur zwei (p38a, p38b).



## **1.6 Die Funktion von Mitgliedern der GCK-VIII Unterfamilie im MAPK-Signaltransduktionsweg**

Für die Vertreter der achten GCK-Unterfamilie wird eine Funktion in den unterschiedlichen MAPK-Signaltransduktionswegen angenommen. So konnte anhand von biochemischen Untersuchungen für Tao1 und Tao2 aus *Rattus norvegicus* gezeigt werden, daß diese eine MAPKKK-Aktivität aufweisen (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Chen et al., 2003). Sowohl Tao1 als auch Tao2 aktivieren MKK3, MKK4 und MKK6 *in vitro* (Chen et al., 2003). Zellkulturexperimente legen jedoch die Vermutung nahe, daß es sich bei MKK4 ausschließlich um ein *in vitro*-Substrat von Tao1 und Tao2 handelt (Chen et al., 2003). Die von Tao1 und Tao2 aktivierten MAPKK, MKK3 und MKK6 sind spezifische Aktivatoren der p38-MAPK (Kyriakis and Avruch, 2001). Somit kann eine Funktion von Tao1 und Tao2 im p38-Signaltransduktionsweg angenommen werden.

Ein weiterer Vertreter der achten GCK-Unterfamilie ist PSK (Moore et al., 2000). Auch für PSK konnte eine Funktion im MAPK-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich gemacht werden. Biochemische Analysen ergaben, daß PSK sowohl MKK4 als auch MKK7 aktiviert (Moore et al., 2000). MKK4 und MKK7 sind spezifische Aktivatoren des JNK-Signaltransduktionswegs (Kyriakis and Avruch, 2001). Eine Aktivierung des p38- und/oder des ERK-Signaltransduktionswegs konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Moore et al., 2000). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von PSK und Tao2 kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei PSK und Tao2 um homologe Proteine handelt (Dan et al., 2001).

JIK ist im Gegensatz zu Tao1, Tao2 und PSK, die als Aktivatoren des MAPK-Signaltransduktionswegs gelten, als ein Inhibitor des MAPK-Signaltransduktionswegs beschrieben worden (Tassi et al., 1999).

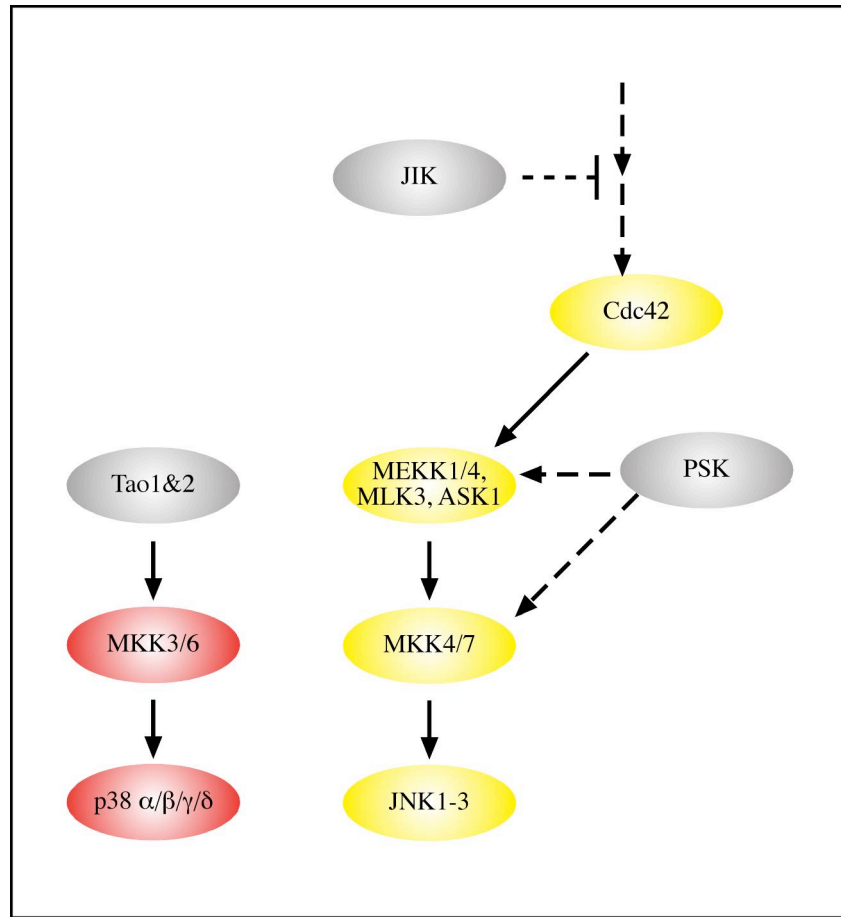


Abbildung 1.4: Übersicht über die Funktion von Tao1, Tao2, JIK und PSK im MAPK-Signaltransduktionsweg

Vereinfachte Darstellung des p38- (rot) und des JNK-Signaltransduktionswegs (gelb). Die Vertreter der achten GCK-Unterfamilie sind grau dargestellt. Direkte Interaktionen sind durch geschlossene Linien dargestellt. Konnte eine direkte Interaktion der beteiligten Proteine nicht eindeutig nachgewiesen werden, sind diese Interaktionen durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Kinasen Tao1 und Tao2 der Ratte aktivieren spezifisch MKK3 und MKK6. Dabei scheinen MKK3 und MKK6 direkt von Tao1 und Tao2 phosphoryliert zu werden. Somit weisen die Kinasen Tao1 und Tao2 der Ratte eine MAPKKK-Aktivität auf (Hutchison et al., 1998, Chen et al., 1999, Chen et al., 2003). Wie anhand von *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden konnte, aktiviert PSK den JNK-Signaltransduktionsweg. Eine Co-Expression von PSK und MKK4/7 in COS1-Zellen hat eine Aktivierung von MKK4 und MKK7 zur Folge. Inwieweit eine direkte Interaktion von PSK und MKK4 bzw. MKK7 vorliegt, konnte nicht geklärt werden (Moore et al., 2000). JIK ist als Inhibitor des JNK-Signaltransduktionswegs beschrieben. An welcher Stelle JIK die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionswegs inhibiert, ist unklar. Eine Aktivierung von JNK durch MAPKKs wie MLK3 oder hirarchisch übergeordnete Kinasen wie Cdc42 kann nicht durch JIK inhibiert werden (Tassi et al., 1999). Daher wird angenommen, daß die Inhibition des JNK-Signaltransduktionswegs durch JIK oberhalb von Cdc42 stattfindet.

Die Expression von JIK in COS7-Zellen reduziert die Grundaktivität von JNK, während die Expression einer inaktiven Form von JIK keinen Effekt auf die JNK-Aktivität hat (Tassi et al., 1999). Eine Inhibition oder eine Aktivierung der p38- und ERK-Signaltransduktionswege konnte jedoch nicht ermittelt werden (Tassi et al., 1999). Die Inhibition des JNK-Signaltransduktionswegs durch JIK scheint oberhalb der MAPKKK-Aktivitäten zu erfolgen (Tassi et al., 1999). Auch deuten weitere Experimente darauf hin, daß eine Regulation der JIK-Aktivität durch die Signaltransduktion des “epidermal growth factor” (EGF)-Rezeptors stattfindet (Tassi et al., 1999).

Zusammenfassend kann für die Vertreter der achten GCK-Unterfamilie eine Funktion in zwei der drei MAPK-Signaltransduktionswege angenommen werden. Tao1 und Tao2 von *Rattus norvegicus* scheinen spezifisch den p38-Signaltransduktionsweg zu aktivieren, während die humanen Kinasen JIK und PSK spezifisch für den JNK-Signaltransduktionsweg zu sein scheinen. PSK wirkt dabei als ein Aktivator, JIK hingegen als Inhibitor (s. Abb. 1.4). Eine Aktivierung oder Inhibition von Proteinen der achten GCK-Unterfamilie des ERK-Signaltransduktionswegs konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

### **1.7 MARK/Par1 sind an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt und werden von Tao1 aktiviert**

Außer der MAPKKK-Aktivität von Tao1, die schließlich zur Aktivierung der p38-MAPK führt (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 2003), konnte eine weitere Funktion dieser Kinase ermittelt werden (Timm et al., 2003). Aus Gehirnexttrakten von Ratten wurde eine Kinase isoliert, welche die “mikrotubule affinity regulating kinase” (MARK) phosphoryliert und somit aktiviert (Timm et al., 2003). Aufgrund dieser Aktivität wurde die Kinase als “mikrotubule affinity regulating kinase kinase” (MARKK) bezeichnet. Sequenzanalysen von MARKK ergaben, daß es sich bei dieser Kinase um Tao1 handelt (Hutchison et al., 1998; Timm et al., 2003). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher nicht die Bezeichnung MARKK, sondern die ursprüngliche Bezeichnung Tao1 verwendet.

Die MARK wurden bei Vetebraten als Kinasen identifiziert, welche Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAP) wie Tau, MAP2 und MAP4 phosphorylieren (Drewes et al., 1995; Drewes et al., 1997; Illenberger et al., 1996). Bei den MARKs handelt es sich um eine evolutionär gut konservierte Familie von Serin/Threonin-Kinasen. Homologe können bei einzelligen Eukaryoten als Kin-1 (Levin and Bishop, 1990), bei Nematoden und *Drosophila* als Par1 identifiziert werden (Kemphues et al., 1988; Shulman et al., 2000).

Ein gemeinsames Merkmal der MARK ist, daß sie an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt sind (Tassan and Le Goff, 2004). In Epithelzellkulturen von Vertebraten sind die MARK an der lateralen Zellmembran lokalisiert. Die Expression dominant negativer MARK in Epithelzellen bewirkt einen Verlust der apikal-basalen Symmetrie der Zellen (Böhm et al, 1997). In *Drosophila* ist das Genprodukt von *par1* an der Etablierung der anterioren-posterioren Köperachse beteiligt (Shulman et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Determinierung der Oozyte und die apikal-basale Polarität der Follikelzellen von Par1 abhängig ist (Cox et al., 2001; Doerflinger et al., 2003). Mutationen im zu *par1* homologen Gen (*kin 1*) von *Schizosaccharomyces pombe* führen zum Verlust der wildtypischen stäbchenförmigen Zellform, und die Zellen nehmen eine Kugelform an (Levin and Bishop, 1990). Auch Par1 aus *C. elegans* ist an der Etablierung der Zellpolarität beteiligt (Guo and Kemphues, 1995).

Aufgrund der aus *in vitro*-Studien und Zellkulturexperimenten erhaltenen Erkenntnisse kann eine Funktion von Mitgliedern der achten GCK-Unterfamilie sowohl im MAPK-Signaltransduktionsweg als auch bei der Aktivierung von MARK angenommen werden. Mit der Aktivierung von MARK/Par1 durch Tao1 ist gezeigt, daß Vertreter der achten GCK-Unterfamilie nicht nur eine Funktion bei der Regulation des MAPK-Signaltransduktionsweg ausüben (Timm et al., 2003). Im Fall von Tao1 von *Rattus norvegicus* konnte gezeigt werden, daß diese Kinase außer einer Aktivierung des p38-Signaltransduktionswegs auch MARK/Par1 phosphoryliert und somit direkten Einfluß auf das Zytoskelett der Zellen nehmen kann (Timm et al., 2003). Neben der Aktivierung des p38-

Signaltransduktionswegs (Hutchison et al., 1998) ist Tao1 also auch an der Aktivierung der MARK/Par1-Kinaseaktivität beteiligt (Timm et al., 2003).

Untersuchungen zur Funktion von Vertretern der achten GCK-Unterfamilie wurden auf organismischer Ebene noch nicht durchgeführt. Über Mutationen in den entsprechenden Genen sowie über die daraus möglicherweise resultierenden Phänotypen ist nichts bekannt. Ebenso wurden Über- und Mißexpressionsstudien in vielzelligen Organismen noch nicht durchgeführt.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, codiert das Genom von *Drosophila* nur eine Kinase, die der achten GCK-Unterfamilie zugeordnet werden kann. Diese wird von dem Gen *tao* codiert. Nach der Identifikation des *tao*-Gens wurde der Frage nachgegangen, welche Funktion das vom *tao*-Gen codierte Protein Tao im MAPK-Signaltransduktionsweg und/oder bei der MARK-Aktivierung ausübt. Hierzu wurden *tao*-Mutanten erzeugt und phänotypisch untersucht. Zum anderen wurden Mißexpressionsstudien durchgeführt. Für diese Studien wurde wiederum das Nervensystem von *Drosophila* als Modell genutzt. Im Vordergrund stand dabei das sich entwickelnde Auge. Dieses stellt ein sensibles System dar, an dem genetische Interaktionen einfach nachgewiesen werden können (Rorth, 1996).

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Identifikation neuer Allele des *troI*-Gens

Der *troI*-Locus von *Drosophila*, ursprünglich als *zeste-white1* bezeichnet, wurde in Region 3A des X-Chromosoms kartiert (Judd et al., 1972; Datta and Kankel, 1992; Flybase, 1999). Die von dem *troI*-Lokus codierte Transkriptionseinheit war trotz einer großen Anzahl von *troI*-Allelen, insgesamt 134 (Flybase, 1999), noch unbekannt. Mit dem Ziel, die vom *troI*-Lokus codierte Transkriptionseinheit zu identifizieren, wurde zunächst eine Kollektion von letalen P-Element-Insertionslinien für Komplementationsanalysen genutzt (s. Abschnitt 4.4.2). Bei den verwendeten Linien handelte es sich ausschließlich um X-chromosomale Insertionslinien, die im Rahmen des Göttinger X-Chromosom-Projekts generiert wurden (Peter et al., 2002). Aus dieser Kollektion wurden diejenigen Linien ausgewählt, bei denen das P-Element in der Region 3A auf dem X-Chromosom inseriert war. Mit diesem Versuchsansatz konnten die drei Insertionslinien *I(1)GO023*, *I(1)GO271* und *I(1)GO374* identifiziert werden. Diese Insertionsmutationen waren nicht in der Lage, die letalen *troI*-Allele *troI<sup>f3</sup>* und *troI<sup>f5</sup>* genetisch zu komplementieren, und stellen also *troI*-Allele dar.

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der P-Element-Integration und der Letalität herstellen zu können, wurden Remobilisierungsexperimente durchgeführt (s. Abschnitt 4.4.3). Für jede der drei genannten P-Element-Insertionen konnte gezeigt werden, daß die Remobilisierung des jeweiligen P-Elements mit einer Reversion des letalen Phänotyps zur Vitalität einhergeht. Die zum Wildtyp revertierten Linien wurden anschließend nochmals für Komplementationsanalysen mit den letalen *troI*-Allelen *troI<sup>f3</sup>* und *troI<sup>f5</sup>* verwendet (Judd et al., 1972). Dabei zeigte sich, daß die revertierten Linien die letalen *troI*-Allele komplementierten. Somit war der Beweis erbracht, daß der letale Phänotyp jeweils durch die Insertion des P-Elements hervorgerufen wurde. Anhand der genetischen Komplementationsanalysen konnte gezeigt werden, daß mit der Insertion der P-Elemente neue *troI*-Allele generiert

wurden. Daher werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die durch die P-Element-Insertion erzeugten *troI*-Allele als *troI*<sup>G0023</sup>, *troI*<sup>G0271</sup> und *troI*<sup>G0374</sup> bezeichnet.

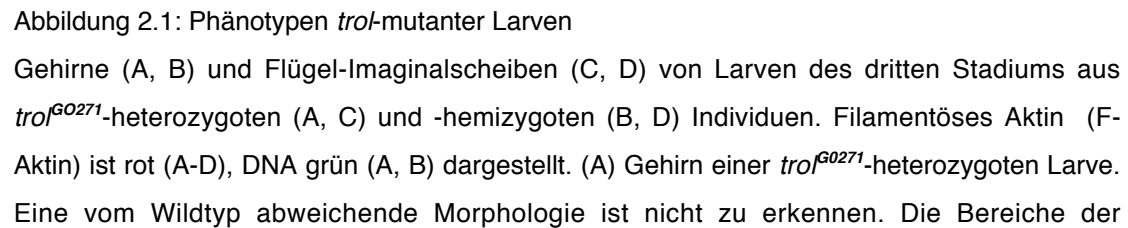
### 2.2 Charakterisierung des Phänotyps *troI*-mutanter Individuen

Bei den neu identifizierten *troI*-Allelen handelt es sich um Letalmutationen. Um diese phänotypisch zu charakterisieren, wurde zunächst der Letalitätszeitpunkt von hemizygoten Männchen der Allele *troI*<sup>G0023</sup>, *troI*<sup>G0271</sup> und *troI*<sup>G0374</sup> bestimmt (s. Abschnitt 4.4.6). Signifikante Unterschiede bezüglich des Letalitätszeitpunktes konnten zwischen den verschiedenen Allelen nicht ermittelt werden. Es zeigte sich bei allen drei Allelen, daß mutante Individuen hauptsächlich im dritten larvalen Stadium sterben. Einige wenige mutante Individuen (ca. 10%) erreichen das Puppenstadium und entwickeln sich dann auch zu adulten Tieren, die jedoch nie die Puppenhüllen verlassen. Eine Letalität in den larvalen Stadien ist auch für die *troI*-Allele *troI*<sup>sd</sup> und *troI*<sup>15</sup> beschrieben (Datta and Kankel, 1992; Shannon et al., 1972).

Darüber hinaus weisen hemizygoten Männchen dieser Allele morphologisch eine deutliche Reduktion der optischen Loben des larvalen Gehirns auf (Datta and Kankel, 1992). Dieser für Mutationen in *troI* charakteristische und namensgebende Phänotyp ("*terribly reduced optic lobes*") ist auf die fehlende Reaktivierung der Proliferation von mitotisch inaktiven Neuroblasten der optischen Loben zurückzuführen (Datta, 1995). Um zu ermitteln, ob die neu identifizierten Allele ebenfalls diesen spezifischen Phänotyp aufweisen, wurden Gehirne von *troI*<sup>G0271</sup>-hemizygoten Larven auf eine Reduktion der optischen Loben hin untersucht.

Gehirne aus *troI*<sup>G0271</sup>-heterozygoten Larven (s. Abb. 2.1 A) unterscheiden sich morphologisch nicht vom Wildtyp. Daher werden im weiteren Verlauf der Arbeit heterozygote Individuen dem Wildtyp gleichgesetzt. Im Gegensatz dazu weisen jedoch die Gehirne von *troI*<sup>G0271</sup>-mutanten Larven ausnahmslos eine starke Reduktion der optischen Loben auf (s. Abb. 2.1 B). Darüber

\_\_\_\_\_





thorakalen Ganglien (TG) und der optischen Loben (OL) sind markiert. (B) Gehirn einer *troI<sup>G0271</sup>*-hemizygoten Larve. Eine starke Reduktion der OL ist deutlich zu erkennen. Andere Bereiche des Gehirns mit Ausnahme der OL können Überproliferationsphänotypen aufweisen (Pfeil). (C) Die Morphologie einer Flügel-Imaginalscheibe eines *troI<sup>G0271</sup>*-heterozygoten Individuums entspricht der des Wildtyps. Hingegen ist die Gesamtgröße einer Flügel-Imaginalscheibe eines hemizygoten Individuums (D) deutlich reduziert und stärker gefaltet. Die Anlage der späteren Flügelfläche ist relativ zur dorsoventralen Achse um 90° gedreht (Stern). Weiterhin ist eine Reduktion derjenigen Bereiche zu erkennen, aus denen das Notum hervorgeht (Pfeilspitze). Die noch an der Flügel-Imaginalscheibe anhaftende Halteren-Imaginalscheibe (Pfeil) weist eine zu starke Faltung auf. Der Balken repräsentiert 100 µm (A-D).

Interessanterweise können mit Ausnahme der optischen Loben auch Überproliferationsphänotypen an diesen Gehirnen beobachtet werden. Diese sind in Umfang und Ort variabel (s. Abb. 2.1 B).

Auch die Imaginalscheiben aus *troI<sup>G0271</sup>*-mutanten Larven weisen eine vom Wildtyp abweichende Morphologie auf. Während Imaginalscheiben aus *troI<sup>G0271</sup>*-heterozygoten Larven dem Wildtyp entsprechen (s. Abb. 2.1 C), sind die Flügelscheiben aus *troI<sup>G0271</sup>*-mutanten Larven stark gefaltet (s. Abb. 2.1 D). In einigen Fällen waren im Vergleich zum Wildtyp signifikant größere Imaginalscheiben zu erkennen, in anderen Fällen deutlich kleinere oder gar keine. Diese variablen und teilweise gegenläufigen Phänotypen deuten darauf hin, daß *troI* außer der Proliferationkontrolle von Neuroblasten auch für andere Aspekte der larvalen Entwicklung benötigt wird, die jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr weiter untersucht werden.

Für die letalen Insertionslinien *I(1)G0023*, *I(1)G0271* und *I(1)G0374* konnte durch Komplementationsanalysen zusammenfassend gezeigt werden, daß (1.) sie bekannte *troI*-Allele nicht komplementieren, (2.) der letale Phänotyp der Insertionslinien auf die Insertion des P-Elements zurückgeführt werden kann und (3.) Gehirne aus *troI<sup>G0271</sup>*-mutanten Larven den für Mutationen in *troI* charakteristischen Phänotyp zeigen. Damit war davon auszugehen, daß bei den drei Insertionslinien das jeweilige P-Element im *troI*-Lokus inseriert ist oder zumindest die *troI*-Transkriptionseinheit funktionell beeinträchtigt.

## 2.3 Identifikation der von *trol* codierten Transkriptionseinheit

Mit Hilfe eines "plasmid rescue" können einem P-Element benachbarte DNA-Sequenzen identifiziert werden (Perucho et al., 1980). Über diese Sequenzen kann dann der Insertionsort des P-Elements im vollständig sequenzierten *Drosophila*-Genom bestimmt werden (Adams et al., 2000). Im Fall der Insertionslinien *I(1)GO023*, *I(1)GO271* und *I(1)GO374* zeigte sich, daß die P-Elemente innerhalb einer Kilobase genomischer Sequenz des Celera-Klons AE003424 (Adams et al., 2000) inseriert sind (s. Abb. 2.2 A).

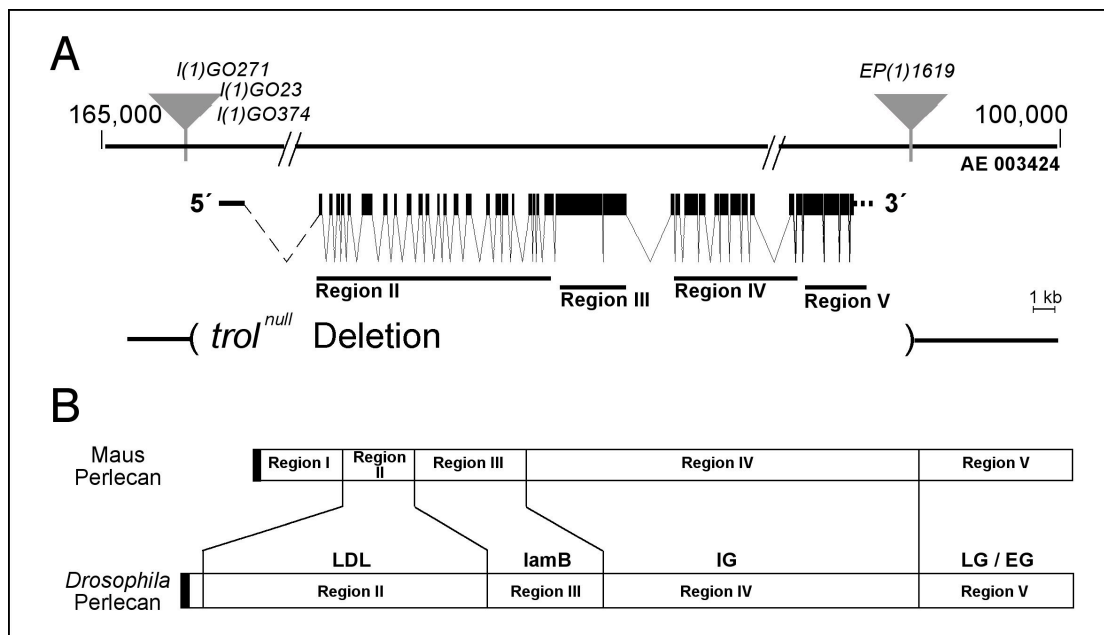


Abbildung 2.2: Genomische Organisation der *trol*-Transkriptionseinheit und Übersicht des von *trol* codierten Proteins

(A) Exon-Intron-Struktur der *trol*-Transkriptionseinheit. Gezeigt sind die *P{lacW}*-Insertionsorte von *I(1)GO023*, *I(1)GO271* und *I(1)GO374* sowie des EP-Elements *EP(1)1619* (Dreiecke) innerhalb der Basenpaare 165.000 bis 100.000 des Celera-Klons AE003424 (Adams et al., 2000). Exons des offenen Leserahmens sind durch Rechtecke, 5'- und 3'-UTRs durch Linien dargestellt. Die codierenden Bereiche, die den Domänen II bis V von Perlecan entsprechen, sind unterhalb des Transkripts dargestellt. Zu beachten ist, daß sich Insertionsorte von transponierbaren Elementen in direkter Nachbarschaft zu dem putativen Transkriptionsstart (*I(1)GO271*) bzw. des Translationsstops (*EP(1)1619*) befinden. Eine schematische Übersicht der *trol<sup>null</sup>*-Deletion, die unter Verwendung der transponierbaren Elemente *I(1)GO271* und *EP(1)1619* generiert wurde, ist dargestellt (s. Abschnitt 4.4.5). Ein Größenstandard von 1 kb ist angegeben. (B) Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von Perlecan der Maus und dem Orthologen aus *Drosophila*. Die für die einzelnen

Regionen charakteristischen Domänen der Perlecan aus Vertebraten sind angegeben. Abkürzungen: LDL: im Low Density Lipoprotein-Rezeptor vorkommende repetitive Sequenzen; lamB: für Laminin B typische Motive; IG: in Immunglobulinen vorkommende Motive; LG: für Laminin Typ G charakteristische Domäne; EG: “Epidermal Growth Factor”-ähnliche Domänen.

Die genetischen Analysen der Allele *tro*<sup>GO023</sup>, *tro*<sup>GO271</sup> und *tro*<sup>GO374</sup> deuten darauf hin, daß die für die Mutation verantwortlichen P-Elemente jeweils im *tro*-Lokus inseriert sind (s. Abschnitt 2.2). Um die von *tro* codierte Transkriptionseinheit zu identifizieren, wurden die genomischen Bereiche, welche die P-Element-Insertionen flankieren, unter Verwendung verschiedener Algorithmen (Altschul et al., 1997) auf das Vorhandensein von offenen Leserahmen hin untersucht. Dabei konnte eine Vielzahl von offenen Leserahmen identifiziert werden, die sich jedoch alle konzeptionell zu einer Transkriptionseinheit verbinden ließen.

Die von mir annotierte Transkriptionseinheit (EBI: Accession Nr. AJ487018) umfaßt insgesamt ca. 60 kb des Celera-Klons AE003424 (Adams et al., 2000). Der offene Leserahmen besteht aus mindestens 40 Exons, wobei aus der konzeptionellen Transkription dieses ORFs eine mRNA von ca. 13 kb resultiert (s. Abb. 2.2 A). Das putative Transkript wurde mit cDNA-Datenbanken verglichen (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Dabei konnten mehrere “Expressed Sequences Tages” (ESTs) identifiziert werden, die eine zur mRNA des annotierten Transkripts identische Sequenzen aufwiesen (SD04592, GM03359 und GM01116). Die vollständige Sequenzierung dieser ESTs ergab, daß diese in der Summe ca. 55% des annotierten Transkripts repräsentierten. Die überlappenden Sequenzen der Klone SD04592, GM03359 und GM01116 beinhalten Teile des annotierten Transkripts, die beim Perlecan der Maus als Regionen III, IV und V bezeichnet sind (s. Abschnitt 2.4). Da für die Region II des annotierten Transkripts keine cDNA-Klone identifiziert werden konnten, wurden Teile dieser Region unter Verwendung von transkriptspezifischen Primern mit Hilfe der “Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) amplifiziert (s. Abschnitt 4.1.10). Anschließend Sequenzanalyse der

amplifizierten Produkte ergab, daß deren Sequenzen zu der des annotierten Transkripts identisch waren.

In unmittelbarer Nachbarschaft der *P{lacW}*-Insertionsorte der Insertionslinien *I(1)G0023*, *I(1)G0271* und *I(1)G0374* konnten zwei ESTs identifiziert werden (GM01493 und GM02428), die jedoch einen ORF aufweisen. Somit könnte es sich bei den von diesen Klonen codierten Sequenzen um 5'-untranslatierte Regionen (5'-UTR) des Gens handeln (s. Abb. 2.2 A), die anzeigen, daß der gesamte ORF des Gens mit den beschriebenen Untersuchungen erfaßt wurde.

### **2.4 *trol* codiert für *Drosophila*-Perlecan**

Nach der Annotation der Transkriptionseinheit des *trol*-Gens wurde die codierte mRNA konzeptionell translatiert. Die erhaltene Aminosäuresequenz wurde anschließend unter Verwendung verschiedener Algorithmen mit Proteinsequenz-Datenbanken verglichen (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Dabei konnte eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Perlecanen aus Mensch und Maus festgestellt werden (Cohen et al., 1993; Noonan et al., 1991). Perlecan ist ein Protein der extrazellulären Matrix und Mitglied der Familie der Heparansulfat-Proteoglycane. Diese sind durch Modifikationen mit Heparansulfat- und Chondroitin-Seitenketten gekennzeichnet (Hassell et al., 1980; Noonan et al., 1991; Danielson et al., 1992).

Im Fall der Perlecanen von Mensch und Maus ist das Protein in fünf Regionen unterteilbar (s. Abb. 2.2 C). Die Region I der Perlecanen weist keine spezifischen Domänenstrukturen auf und wird daher als "unique domain" bezeichnet. Die Regionen II bis V hingegen sind durch eine spezifische Abfolge bestimmter Domänen gekennzeichnet und weisen darüber hinaus Homologien zu anderen Proteinen auf. So ist die Region II von Perlecanen der Vertebraten durch Domänen charakterisiert, wie sie auch in "low density lipoprotein" (LDL)-Rezeptoren zu finden sind. Die Region III ist den N-terminalen Bereichen der kurzen Ketten von Laminin A und B ähnlich.

“Neuronal cell adhesion molecules” (N-CAM) ähneln der Region IV, die globulären Bereiche des C-Terminus von Lamin A hingegen gleichen der Region V von Perlecan (Noonan et al., 1991; Kallunki and Tryggvason, 1992; Noonan and Hassell, 1993).

m-LDL-R 1	NECVALEYRCDRRPDCRDMSE
m-LDL-R 2	GHCIPRDYLC DGQEDCRDGSDE
m-LDL-R 3	GHCALKLWRC DGDFDCEDRTDE
m-LDL-R 4	NRCIPASFHCDEESDCPDRSDE
d-LDL-R 1	GDCIDARKRCNNVSDCSEGEDE
d-LDL-R 2	TRCISVSQQCDGHSDCSGDDE
d-LDL-R 3	LSCISIVHRC DGRADCPNDRSD
d-LDL-R 4	GECIPMRQVC DN IYDCNDYSDE
d-LDL-R 5	NVCIPHLRLCDGFYHCNDMSDE
d-LDL-R 6	RDCISIESVCDGIPDCGRNEDE
d-LDL-R 7	GGCIPKSQVCDGKPCCHDRSDE
d-LDL-R 8	GSCISGYKRCNGIHDCADASDE
d-LDL-R 9	SQCLPLEKKCDGYADCEDMSDE
d-LDL-R 10	SYCLPRDQLCNGIPNCQDGSDE
d-LDL-R 11	GECVADNQRNCNGIADCADGSDE
d-LDL-R 12	GTCVSRRIKCDGIRDCLDGYDE
d-LDL-R 13	LECIDSSLQCN EIKDCSDGSDE
d-LDL-R 14	ESCYNRSVRCNGHVDSCDGSDE
d-LDL-R 15	GRCYTESERC DRHRHCE DGSDE
d-LDL-R 16	QFCINATQQCDGYDCRDFSDE
d-LDL-R 17	GDCVSGSAPCNGYSECSDHSDE
d-LDL-R 18	GQCVSSSVRCNGRTDCQDSSDE
d-LDL-R 19	GPCISLGLKCNGRVDCPYDGSDE
d-LDL-R 20	GECIDKSSICDGNPDCSDASDE
d-LDL-R 21	SKCVDRTWRC DGENDCGDNSE
d-LDL-R 22	GHCIPKSFQCDNVPDCTDGTDE

Abbildung 2.3: Vergleich der LDL-Rezeptor-Motive von Maus- und *Drosophila*-Perlecan. Während in Region II vom Perlecan der Maus lediglich vier LDL-Rezeptor-Motive (mLDL-R) zu finden sind, weist das Homologe aus *Drosophila* mindestens 22 dieser Motive auf (dLDL-R). Die Reihenfolge der aufgelisteten Motive spiegelt deren Abfolge im jeweiligen Protein wider. m-LDL-R 1 bis 4 sind repräsentiert durch die Aminosäuren 210-231, 295-316, 335-356 und 379-400 des Perlecans der Maus (NP\_032331). Die 22 LDL-R von *Drosophila* Perlecan werden durch die Aminosäuren 38-59, 78-99, 123-144, 204-225, 293-314, 402-423, 441-462, 490-511, 544-565, 584-605, 621-642, 659-680, 721-742, 769-790, 805-826, 845-866, 882-903, 922-943, 990-1011, 1176-1197, 1216-1237 und 1259-1280 repräsentiert.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Perlecan von Maus und Mensch wurde das Protein der Maus als Repräsentant der Perlecan von Vertebraten ausgewählt und näher mit dem Homologen aus *Drosophila* verglichen (s. Abb. 2.2 C). Der hauptsächliche Unterschied ist das Fehlen der Region I. Eine der Region I entsprechende Sequenz ist im Genom von *Drosophila* nicht zu finden (Baumgartner, persönliche Mitteilung). Diese Region ist anscheinend spezifisch für Perlecan der Vertebraten, da sie auch im homologen Protein

von *C. elegans* fehlt (Rogalski et al., 1993). Die Region II hingegen ist bei *Drosophila*-Perlecan (Trol) deutlich länger als bei dem Homologen der Maus. Zwischen den Regionen III bis V sind kaum Unterschiede in der Domänenabfolge zu erkennen. Ein detaillierter Vergleich der für die unterschiedlichen Regionen charakteristischen Domänen ist in den Abbildungen 2.3-2.5 gezeigt. Dabei wurden die Regionen II bis IV berücksichtigt. Eine ausführliche Beschreibung der Region V wurde bereits durchgeführt (Friedrich et al., 2000).

Bei den LDL-Rezeptor-Motiven (LDL-R) handelt es sich um eine cysteinreiche, repetitive Sequenz. Nahezu jedes Exon aus Region II codiert für ein LDL-R. Einige der größeren Exons codieren sogar für zwei LDL-R, hingegen wurde für einige der kleinen Exons in der Computer gestützten Analyse kein LDL-R bestimmt. Allerdings konnten von mir und R. Pflanz für diese Exons degenerierte LDL-R identifiziert werden.

m lamB 1	1	LVHDAFWALPKQFLGNKVDSYGGFLRYKV...RYE.LARGMLEPVQK...	43
m lamB 2	1	LSEPIFWSLPASFRGDKVTSYGGELRFTV...MQRPRPSSA..PLHRQ..	43
m lamB 3	1	~~ESFYWQLPEIYQGDKVAAYGGKIRYTL...SYTAGPQGS..PL.LD..	40
d lamB 1	1	~~~~YLALPADYMGNQLKS YGGNLR YE V...NYRG...SGR...PVN...G	35
d lamB 2	1	~~~~LYWSLPAAFLGNKLSSYGGKITYTL...SYSPLPNGI...MSRNSA	40
d lamB 3	1	~~~PKYWSLRGSVLGNQLFSYGGRLSYSLIVESY.....G.....NYERG	37
m lamB 1	44	PDVILV.GAGYRL.H...SRGHTPT..HPGTLNQ..RQVQLSE.EH.VHE	83
m lamB 2	44	PLVVL.QGNNIVLEHH.ASR...DPS...PGQPSN..FIVPFQE.QAVQRP	83
m lamB 3	41	PDIQI.TGNNIMLV...ASQ...PALQGPERRSY..EII.FRE.EFWRRP	79
d lamB 1	36	PDVII.TGNRFTLT YRVRTQ.....PGQNNR..VSIPFVP.GGQKQK	31
d lamB 2	41	PDVVIKSGEDLRLIHYRKSQ.VVPSVA.....NT..YSVEIKE.SAVQRG	81
d lamB 3	38	HDIVLI.GNGLKLIW...SR...PD....GNENQEEYNVRLHEDEQVTRQ	76
m lamB 1	84	S...GRPVQRAEMLQALASLEAVLLQTVYNTKMA.SVGLSDIVMDTTV~	127
m lamB 2	84	D...GQPATREHLLMALAGIDALLIQASY.TQQPAESRLSGISMDVAVP	128
m lamB 3	80	D...GQPATREHLLMALADLDLIVRATF.SSVPRASISAVSLEGAQP	124
d lamB 1	74	D...GRKASREEIMMILANVDNILIRLG YLDSTAREVDLINIALDSA~~	117
d lamB 2	82	D...EVVANREHVLMAISDITAIYIKATY.TTSTKEASLRQVTLDVATP	126
d lamB 3	77	DRESARPASRSDFMTVLSDLQHILIRAT.PRVPTQSTSIGNVILESAV~	123

Abbildung 2.4: Vergleich der Region III von Maus- und *Drosophila*-Perlecan

Die Region III der Perlecan aus Maus und *Drosophila* ist durch jeweils drei Laminin B-typische Domänen gekennzeichnet (m lamB 1 bis 3 und d lamB 1 bis 3). Die Reihenfolge der aufgelisteten Domänen ist mit deren Abfolge im jeweiligen Protein identisch. m lamB 1 bis 3, codiert durch die Aminosäuren 590-716, 985-1112 und 1393-1516; d lamB 1 bis 3 repräsentiert durch die Aminosäuren 1475-1591, 1839-1964 and 2190-2312.

Diese wurden in dem in Abbildung 2.3 dargestellten Sequenzabgleich nicht berücksichtigt.

Wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist, weisen die Perlecan aus Maus und *Drosophila* drei konservierte Domänen auf, wie sie für Laminin typisch sind (Noonan et al., 1991). Diese als Laminin B-Domänen bezeichneten Sequenzen codieren ein extrazelluläres Modul mit unbekannter Funktion, das in verschiedenen Proteinen wie z.B. Netrin und Integrin zu finden ist.

mIG 1	1	-QS	IQASRGQ	TVTFT	VAT	GVPT	PIINRLNWGHIPAHPRVTMTSEGGRETLIIIRDVKEADQ	CAIT	CEAMNSRG	VMVFG	-----	77						
mIG 2	1	PSRS	VVPQGGPHSLR	QVS	..GS	PHFYNSR	EDGRPLSSAQORHOGSELHFPSPVQPSDAGV	IT	TCRNLIHTS	NSRAELLV	---	81						
mIG 3	1	RSQSV	VRPGADVTFI	TA	KS	KSPAYTLVNTRL	..HNGKL	PSRA	..MDFNGILTRNVQPSDAGV	IT	TCGNMFAMDQGTATLHVQ	---	80					
mIG 4	1	PPQLT	VQPGQQAEPFR	SAT	GNPT	MLEWIG	..G	PSGQL	PAKAQI	..HNGILRLPAIEPSDQ	QIL	CRALSSAG	QHVARAMLQVH	---	80			
mIG 5	1	PERTQV	HEGRIVRLY	CRAA	GVPS	ASITWRK	..E	GGSL	PFKHQA	..HGSRLRLHHMSVADS	CE	LV	CRANNN	---	66			
mIG 6	1	-----	VAGGQTL	DLN	VVP	GHAHAQV	TWHK	..R	GGSL	PTHHT	..HGSRLRLYQVSSADS	CE	LV	SVLSSSGP	LEASVLVST	---	74	
mIG 7	1	SSSRV	VAGGQTL	DLN	VVP	GHAHAQV	TWHK	..R	GGSL	PAGHQV	..HGHMLRLNRVSPADS	CE	LV	SVTSSSGT	LEASVLVST	---	78	
mIG 8	1	SSSSHL	TGQTV	DLK	VVP	GHAHAQV	TWHK	..R	GGSL	PARHQT	..HGSLLRLYQLSPADS	CE	LV	QVAGSSHP	HEASFKLT	---	79	
mIG 9	1	GPVHV	KMGKDITL	EL	ISS	GEPRSS	PRNTRLG	IFVKLE	PRMFLMNSHAMLKIASVKESD	ACT	LV	QAGNALGT	AAKQV	ELV	---	82		
mIG 10	1	SELLE	EAGHATLH	SAT	GNPT	MLEWIG	..S	K	LRAPL	PWQRL	..EGNTLV	IPMAQDS	QIL	CRATNSAG	HTEATVVLHV	---	78	
mIG 11	1	PEHTS	AQGNLVOLQ	LAH	GTPE	PLTYON	..S	L	VGGVL	PEKAVV	..RNQLLRLEPTV	EEDS	CR	QVSVSRV	SAEAF	PAQVLVQ	---	79
mIG 12	1	PLE	ERNIGASVEPH	AV	PNERG	THLRNLKE	..GGQ	LPPGHS	..VOD	GVLR	IQHLDONCO	CT	V	QAGHPW	QQAQTAQ	ELV	---	79
mIG 13	1	-----	EFE	LAL	GDPK	POVTSKV	..GHLRF	..	GIVOS	GTIIRIAHVELADA	Q	CR	CAATNAAGT	QSHVLLVQ	---	67		
mIG 14	1	PEIRV	PAGSAAVFP	MAS	GYTP	PAITH	..S	K	VDGDL	PPDSRL	..ENNMLMLPSVR	EEDACT	V	CTATNRQ	Q	KVKAFAYLQV	---	78
dIG 1	1	PSQ	IKESREVIFR	CR	DEG	PARAKVKNSRPG	..GRPE	PPG	..FTDR	NRGRLETPNIRVEDACT	V	CEAVGYAS	YIPGQVTV	---	78			
dIG 2	1	-----	T	VAT	GVPT	PIINRLNWGHV	..DKCESKSYGGT	GLRCPDMR	PDSCA	SC	EIINTRG	THFVNPD	TI	---	69			
dIG 3	1	PEITTV	PPGGHNTES	SGR	MRSNSP	PIVNNYK	ENSR	LEENVEV	..QSGN	LIYIDLQVSDS	GV	IC	QAVNN	---	69			
dIG 4	1	PEHV	FEYVNNELI	EV	L	GN	EAERVWAV	..	DGRAD	AQSTRTYDNRLIFD	SPRKSDE	CR	R	QAEH	DNRR	EKTVIYVQ	---	80
dIG 5	1	PEEING	LAGEFQIN	QFTS	VAS	LRIDHSHNGRSLSS	PARHVEIR	..GNT	LEV	RDA	SEDS	GV	T	V	VDVTR	RRNFTESARVHI	---	84
dIG 6	1	QNIL	ITOGEDYST	ELAS	GSFY	ESIKWAKVH	..	DPME	FNVTISGN	..VLT	TYGARFENR	GV	S	VAE	NDHSDLS	STSDIE	---	78
dIG 7	1	PLQ	FFSGAPASLY	TV	EGID	DDTEVHVRV	..DQPS	ERHK	..IQSP	GYMVDDIQLEDS	D	E	CR	AKKIV	GEATGVATTIVQ	---	80	
dIG 8	1	RDRL	RTGDELSIT	VGS	GVN	PEVEHVNEM	..	ALKRD	LYSPPSNTAILKTYRVTKADA	CI	T	HGK	NEAGS	DEAHVRVEVQ	---	80		
dIG 9	1	-----	IGDNV	TLT	DM	..FOPL	..	NTRN	ERVDAELPRMAYTIK	NRLETVRVEQNLQ	CR	NGI	GRDG	---	60			
dIG 10	1	PLT	VEAGQNLVH	QVENVRE	..	DVH	NSTDNNRPLSSVRIVGSV	LVRFV	SITQAA	ACE	CR	S	AF	MOYGNRSQ	IARVAVK	---	78	
dIG 11	1	-----	REGENI	Q	TVTD	QYGVRAQDNVEFN	WFRD	DRPLNN	MARTDSQILVLTNL	REDA	CR	IC	---	62				
dIG 12	1	-----	RAGE	STDVE	YSSD	..	DYTV	DVVNERSDGA	PLSNVROVGNRLVISNV	ESDAGN	V	CK	KTDE	GDLYTTSYK	LEVE	---	75	
dIG 13	1	-----	VYAKV	GANADLQ	GA	DES	RQPTYRNSRQ	..YGO	LA	GRS	..LMN	EKLS	LD	SVQ	ANDACTY	CTAQ	---	75
dIG 14	1	-----	GANADLQ	GA	DES	RQPTYRNSRQ	..YGO	LA	GRS	..LMN	EKLS	LD	SVQ	ANDACTY	CTAQ	---	56	

Abbildung 2.5: Vergleich der Domäne IV von Maus- und *Drosophila*-Perlecan

Beide Perlecan weisen 14 Immunglobulin-ähnliche Motive auf (mIG 1 bis 14 und dIG 1 bis 14). 13 der mIG sowie zwölf der dIG Motive sind in Domäne IV, die weiteren im Bereich zwischen den Domänen II und III zu finden. Die Reihenfolge der aufgelisteten Motive spiegelt deren Abfolge im jeweiligen Protein wider. mIG 1 bis 14 werden durch die Aminosäuren 414-490, 1682-1762, 1778-1857, 1871-1950, 1961-2026, 2063-2136, 2156-2233, 2253-2331, 2442-2523, 2540-2617, 2626-2704, 2727-2805, 2828-2894 und 2902-2979 repräsentiert. *Drosophila* Igs 1 bis 14 codiert durch die Aminosäuren 1041-1118, 1307-1375, 2416-2484, 2513-2592, 2609-2692, 2711-2788, 2801-2880, 2892-2971, 3014-3073, 3098-3175, 3192-3253, 3309-3383, 3395-3469 und 3500-3455.

Bei den IG-ähnlichen Domänen handelt es sich um eine der am weitesten verbreiteten Proteindomänen im Tierreich. Sie sind heterogen in der Sequenz, bilden jedoch eine konservierte Tertiärstruktur aus. Obwohl IG-ähnliche Domänen in einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen, wie z.B. Chaparonen, Enzymen und Rezeptoren, zu finden sind, scheinen sie immer funktional auf die Bindung von Liganden beschränkt zu sein. Die Liganden, welche mit IG-ähnlichen Domänen interagieren, weisen

entsprechend der Sequenzheterogenität der Domänen eine große Diversität auf (Bork et al., 1994; Halaby et al., 1999; Halaby and Mornon, 1998). Zu den gebundenen Liganden gehören kleine Moleküle wie Chromophore, Hormone oder auch große Proteine der extrazellulären Matrix.

Die für die einzelnen Regionen vom Perlecan der Maus charakteristischen Domänen wurden mit dem Homologen aus *Drosophila* verglichen (s. Abb. 2.3-2.5). Es stellte sich heraus, daß die einzelnen Domänen untereinander hoch konserviert sind. Desweiteren ist mit Ausnahme der Region II auch deren Anzahl und Abfolge in den verglichenen Proteinen nahezu identisch. Somit war davon auszugehen, daß es sich bei dem von mir annotierten Protein tatsächlich um *Drosophila*-Perlecan handelt. Weitere Sequenzanalysen ergaben, daß im gesamten Genom von *Drosophila* keine weitere Transkriptionseinheit zu identifizieren ist, welche für ein Protein mit ähnlicher Domänenabfolge codiert. Diese Beobachtungen zeigen, daß die von mir annotierte Transkriptionseinheit die einzige ist, welche im *Drosophila*-Genom für ein zum Perlecan der Vertebraten orthologes Gen in Frage kommt. Es war daher naheliegend, für das *trol*-Genprodukt eine Perlecan-ähnliche Funktion anzunehmen.

### 2.5 Expression von *trol*

Die räumliche und zeitliche Verteilung der RNA eines Gens kann mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungsexperimenten (s. Abschnitt 4.2.5) an Ganzpräparaten von Embryonen, Imaginalscheiben und Ovarien ermittelt werden (Tautz and Pfeifle, 1989). Für die in den Abbildungen 2.6 und 2.7 gezeigten RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimente wurden für das *trol*-Transkript spezifische Gegenstrang-Sonden verwendet. Transkripte des *trol*-Gens konnten sowohl während der Oogenese (s. Abb. 2.6 A) als auch in der Embryogenese von *Drosophila* nachgewiesen werden (s. Abb. 2.6 B1-3). Die während der Oogenese von den Nährzellen transkribierten mRNAs werden der Oozyte zugeführt und sind als "maternale Komponente" im synzytialen Blastoderm des Embryos nachweisbar (s. Abb. 2.6 B1).



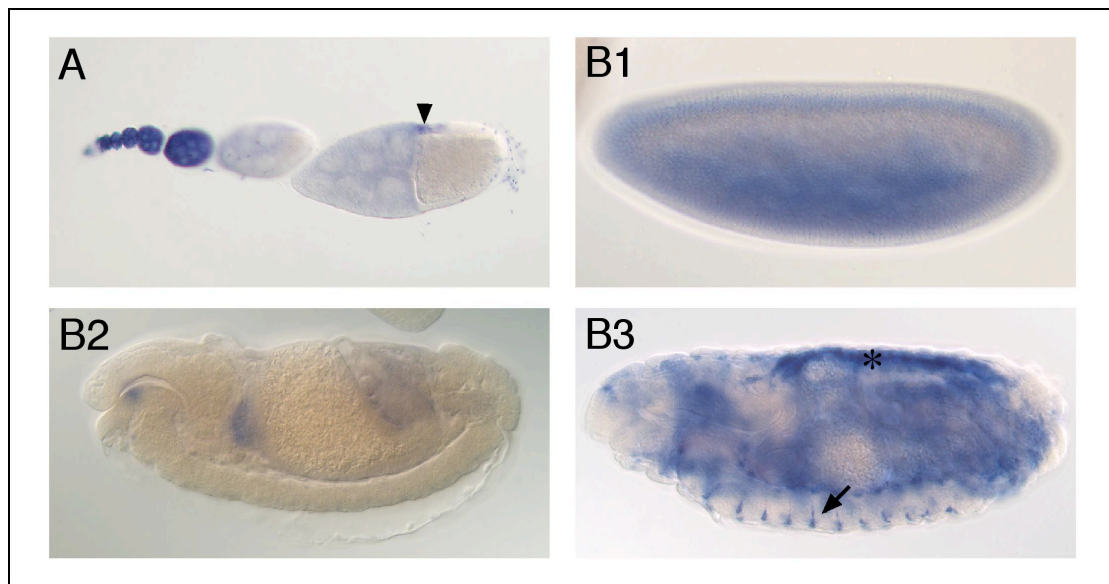


Abbildung 2.6: RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimente an Embryonen und Ovarien  
*trol*-Expression während der Oogenese (A) und der Embryonalentwicklung (B1-3) von Wildtyp-Tieren. (A) Ovariole einschließlich Germar und Eifollikeln verschiedener Stadien. Eine Akkumulation von Transkripten an der Spitze des Germariums ist zu beobachten (linke Seite). In den Regionen I und IIa des Germars kann keine Expression von *trol* nachgewiesen werden. Ab dem Stadium IIb der Oogenese ist eine Wiederaufnahme der Transkription zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Oogenese sind Transkripte in den Nähr- und Follikelzellen von Eikammern der Stadien 2-6 detektierbar. Mit Beginn der Vitellogenese (Stadium 8) wird die Expression schwächer und ist auf die Nährzellen reduziert. Eine Ausnahme bilden wenige dorsale Follikelzellen, die sich oberhalb des Oozytenkerns befinden (Pfeilspitze). (B1) Embryo des synzytialen Blastoderms. Eine ubiquitäre Akkumulation von Transkripten ist zu erkennen. (B2) Embryo im Stadium 13 der Embryonalentwicklung. Beginn der zygotischen Expression. (B3) Embryo des Stadium 15. Eine zygotische Expression ist eindeutig nachweisbar. Transkripte sind im Fettkörper, den Herzvorläuferzellen (Stern), dem viszeralem Mesoderm sowie dem Mittel- und Hinterdarm und in einzelnen Zellen des zentralen Nervensystems (Pfeil) zu detektieren.

Mit Beginn der Zellularisierung des Embryos ist eine Abnahme der Transkriptmenge erkennbar. Eine eindeutig zygotische Expression von *trol* kann erst ab dem Stadium 15 der Embryogenese nachgewiesen werden. Eine starke Akkumulation von zygotischen Transkripten ist in den Herzvorläuferzellen sichtbar, die auch im sich entwickelnden Herzen erhalten bleibt. Weiterhin sind Transkripte im Fettkörper, dem Mittel- und Hinterdarm sowie in einigen Zellen des zentralen Nervensystems zu erkennen (vgl. Abb.

2.6 B2 und B3). Die in der Abbildung 2.6 gezeigten embryonalen Expressionsdomänen wurden mit einer für das *trol*-Transkript spezifischen Gegenstrang-Sonde ermittelt. Diese Sonde wurde aus Sequenzen generiert, die der Region III von *Trol* entsprechen (s. Abb. 2.2 B). Wurden andere Bereiche des Gens zur Herstellung von Gegenstrang-Sonden verwendet und für Hybridisierungsexperimente genutzt, dann konnten die gleichen Expressionsdomänen ermittelt werden. Dies galt sowohl für codierende als auch für nichtcodierende Bereiche der Transkriptionseinheit, welche durch die ESTs GM01493 und GM02428 repräsentiert sind (s. Abb. 2.2 A). Letztere Befunde unterstützen die These, daß der gesamte Umfang möglicher *trol*-Transkripte identifiziert wurde (s. Abschnitt 2.3).

Hemizygote *trol*-mutante Individuen sterben in den larvalen Stadien (s. Abschnitt 2.2). Daher konnte auch die Expression von *trol* oder zumindest eine Restaktivität des Proteins während larvaler Stadien angenommen werden. Um experimentell zu prüfen, ob *trol* auch larval exprimiert wird, wurden *in situ*-Hybridisierungen an Imaginalscheiben und Gehirnen aus Larven des dritten Stadiums durchgeführt (s. Abb. 2.7).

Die Abbildung 2.7 zeigt, daß *trol* sowohl in den verschiedenen Imaginalscheiben als auch im Gehirn von Larven des dritten Stadiums exprimiert wird. Die jeweiligen Expressionsdomänen sind im Fall der Imaginalscheiben in denjenigen Bereichen zu finden, aus denen im adulten Tier die Strukturen hervorgehen, die eine große Zahl von sensorischen Borsten aufweisen. Hierzu gehören z.B. die borstenreiche Region unterhalb des adulten Auges, welche aus der Augen-Imaginalscheibe hervorgeht (s. Abb. 2.7 A), und die aus der Flügel-Imaginalscheibe hervorgehenden Bereiche des Notums (s. Abb. 2.7 C). In Bein-Imaginalscheiben ist eine Expression in konzentrischen Ringen zu beobachten. Darüber hinaus ist auch eine Expression in den Bereichen der Bein-Imaginalscheibe zu erkennen, aus welcher die ebenfalls borstenhaltigen, lateralen Bereiche des Thoraxes hervorgehen (s. Abb. 2.7 B).

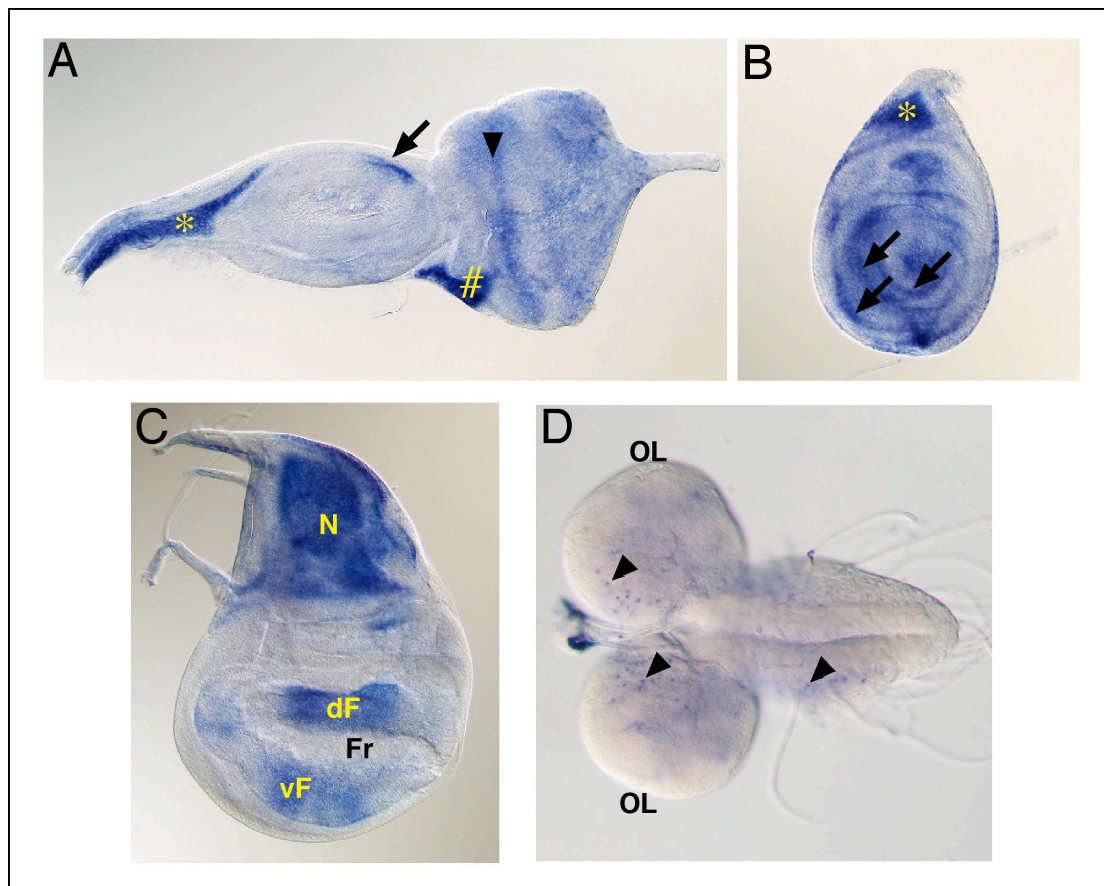


Abbildung 2.7: RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimente an larvalen Gehirnen und Imaginalscheiben

*trol*-Expression in Imaginalscheiben (A, B und C) und Gehirn (D) von Larven des dritten Stadiums. (A) Augen- und Antennen-Imaginalscheibe. Eine Akkumulation von Transkripten in der Antennen-Imaginalscheibe (links) ist in einem distinkten Bereich zu beobachten (Pfeil). Aus diesem gehen später Teile des ersten Segments der Antenne hervor. Die anterior zur Antennen-Imaginalscheibe gelegenen Strukturen (Stern) weisen eine starke Akkumulation von Transkripten auf. In der Augen-Imaginalscheibe (rechts) ist eine schwache ubiquitäre Expression von *trol* nachweisbar. Eine stärkere Expression kann sowohl in der morphogenetischen Furche (Pfeilspitze), als auch in einer weiteren Region der Augen-Imaginalscheibe beobachtet werden (Parallelogramm). Aus dieser Region gehen die Bereiche der Kopfkapsel hervor, die sich in der adulten Fliege unterhalb des Auges befinden. (B) Bein-Imaginalscheibe. Hier ist eine Akkumulation der RNA in konzentrischen Ringen zu erkennen (Pfeile). Desweiteren ist eine Expression in Bereichen zu erkennen, aus denen laterale Teile des Thoraxes hervorgehen (Stern). (C) Flügel-Imaginalscheibe. Auch hier kann eine Expression in den Bereichen nachgewiesen werden, aus denen Teile des Exoskeletts, in diesem Fall das Notum (N), hervorgehen. Die Bereiche, aus denen die dorsale (dF) und ventrale (vF) Flügeloberfläche hervorgehen, weisen ebenfalls eine Akkumulation an RNA auf, die des Flügelrands (Fr) sind jedoch frei von Transkripten. Dies gilt ebenso für die Bereiche

aus denen das Flügelgelenk gebildet wird. (D) Gehirn einer Larve des dritten Stadiums. Neben einer schwachen diffusen Expression im Bereich der thorakalen Neuroblasten ist in einigen Zellen eine stärkere Akkumulation von Transkripten zu beobachten (Pfeilspitzen). In den optischen Loben (OL) hingegen ist keine Expression von *troI* nachweisbar.

In Gehirnen des dritten Larvenstadiums konnte nur eine schwache Expression von *troI* nachgewiesen werden (s. Abb. 2.7 D). Mit Ausnahme der optischen Loben können in beiden Hemisphären und im Bereich der thorakalen Neuroblasten einzelne Zellen identifiziert werden, die eine starke Akkumulation von Transkripten aufweisen. Um welchen Zelltyp es sich hierbei handelt, wurde nicht näher untersucht.

### 2.6 Deletion des *troI*-Lokus und die Erzeugung von Keimbahnklonen

Nach der Identifikation der Transkriptionseinheit von *troI* wurde der Versuch unternommen, eine Nullmutation für das Gen herzustellen. Bei den Allelen *troI*<sup>G0023</sup>, *troI*<sup>G0271</sup> und *troI*<sup>G0374</sup> handelt es sich mutmaßlich um hypomorphe Allele, da für die einzelnen Allele hemizygoten Individuen noch das dritte Larvenstadium erreichen, und sich wenige Individuen sogar bis zu Adulten entwickeln, jedoch die Puppenhülle nicht verlassen (s. Abschnitt 2.2). Für das starke Allel *troI*<sup>sd</sup> ist jedoch ein Letalitätszeitpunkt im zweiten larvalen Stadium beschrieben (Datta and Kankel, 1992).

Um eine Null-Mutation zu erhalten, wurde der Versuch unternommen, den gesamten codierenden Bereich von *troI* zu deletieren. Durch simultane Remobilisierungs- und Rekombinationsereignisse von zwei benachbarten Elementen in *trans* kann eine Deletion definierter Größe generiert werden. Im Fall der Transkriptionseinheit von *troI* wurden die transponierbaren Elemente der Insertionslinien *I(1)G0271* und *EP(1)1619* verwendet. Es konnte eine Deletion erzeugt werden, die den gesamten codierenden Bereich des *troI*-Gens, jedoch keine weitere Transkriptionseinheit deletiert (s. Abb. 2.2 A). Anschließende Komplementationsanalysen ergaben, daß die Defizienz-Mutation durch die *troI*-Allele *troI*<sup>13</sup> und *troI*<sup>15</sup> nicht komplementiert werden konnte. Die Deletions-Mutante kann daher als gesichertes *troI*<sup>null</sup>-Allel

bezeichnet werden. Bei der Bestimmung des Letalitätszeitpunktes *tro<sup>null</sup>*-mutanter Individuen konnte eine polyphasische Letalität in den larvalen und pupalen Stadien ermittelt werden.

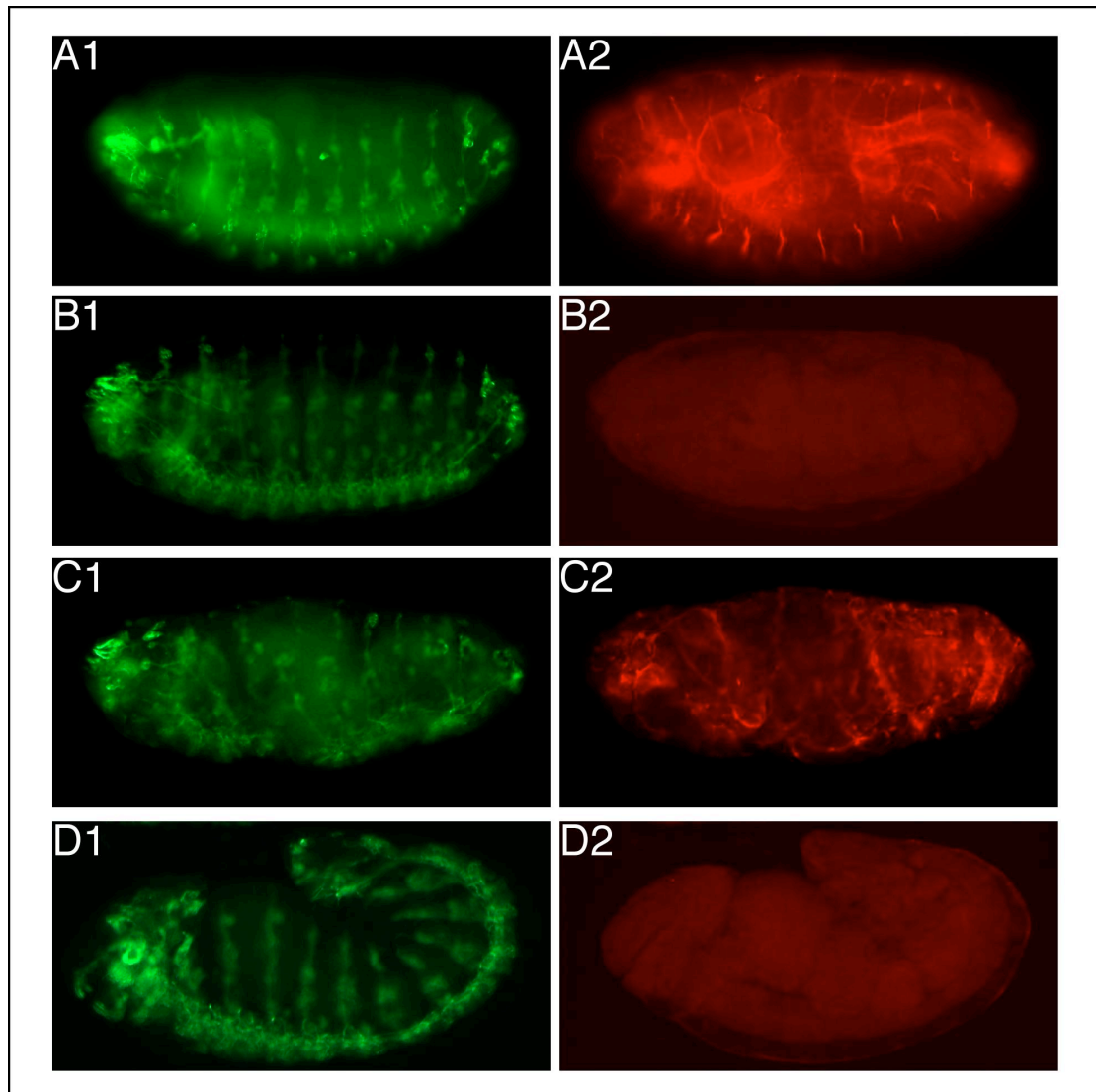


Abbildung 2.8: Antikörperfärbungen an Embryonen ohne maternalen Beitrag von *tro*  
Gezeigt sind Epifluoreszenzaufnahmen der embryonalen Stadien 15-17. Die hier gezeigten Embryonen stammen von Weibchen mit *tro<sup>null</sup>*-Keimbahnklonen, welche mit *tro<sup>l5</sup>*-mutanten Männchen gekreuzt wurden. Gezeigt ist die Verteilung des Proteins Futsch (grün) zur Markierung neuronaler Strukturen (A1-D1) und die Verteilung von Trol (rot) in den entsprechenden Embryonen (A2-D2). (A, B) Embryonen, deren neuronale Strukturen morphologisch dem Wildtyp entsprechen (A1, B1). Eine zygote Expression von Trol ist in A2, jedoch nicht in B2 nachweisbar. (C, D) Embryonen, deren neuronale Strukturen morphologisch nicht denen des Wildtyps entsprechen (C1, D1). Eine Expression von Trol ist in einem Fall nachweisbar (C2), der Embryo (D2) weist keine Perlecanexpression auf.

Durch die Erzeugung von Keimbahnklonen, die homozygot für *tro<sup>null</sup>* sind, ist es möglich, Embryonen zu erhalten, denen der maternale Anteil der *troI*-Transkripte fehlt. In vielen Fällen wird durch die Reduktion des maternalen Beitrags eines Transkripts eine Verstärkung des zygotischen Phänotyps erreicht (Chou and Perrimon, 1992). Um zu untersuchen, ob dies auch für das *tro<sup>null</sup>*-Allel zutrifft, wurden Weibchen mit *tro<sup>null</sup>*-Keimbahnklonen generiert (s. Abschnitt 4.4.7). Dabei zeigte sich, daß ein Verlust der maternalen Komponente durch zygotische Expression von *troI* kompensiert werden kann. Embryonen, die sowohl maternal als auch zygotisch *tro<sup>null</sup>*-mutant sind, sterben im ersten bis dritten larvalen Stadium. Auf eine weitergehende Untersuchung der larvalen Phänotypen wurde aufgrund der polyphasischen Letalität verzichtet.

Die Analyse von Embryonen, denen der maternale Beitrag von *troI*-Transkripten fehlt, ergab, daß weniger als 5% aller Embryonen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp aufwiesen. Neben Embryonen ohne morphologische Abnormalitäten (s. Abb. 2.8 A, B) konnten Embryonen identifiziert werden, bei denen eine Rotation um die Längsachse des Embryos stattgefunden hatte (s. Abb. 2.8 C). Darüber hinaus konnten Embryonen mit unvollständiger Keimbandverkürzung identifiziert werden (s. Abb. 2.8 D). Wie gezeigt werden konnte, weisen maternal mutante Embryonen (s. Abschnitt 4.4) mit und ohne zygotische Expression von *TroI* einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf (s. Abb. 2.8 C2, D2). Somit war davon auszugehen, daß der mutante Phänotyp von einer zygotischen Expression von *TroI* unabhängig ist. Aus diesem Grund wurden keine über diesen Befund hinausgehende Analysen bezüglich der Ursache dieses vom Wildtyp abweichenden Phänotyps durchgeführt.

## **2.7 Identifikation von Tao, dem einzigen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie in *Drosophila***

Der achten GCK-Unterfamilie werden in Vertebraten drei Proteine zugeordnet: Tao1, Tao2/PSK und JIK (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Tassi et al., 1999; Moore et al., 2000; Dan et al., 2001). Mit dem Ziel, Vertreter dieser GCK-Unterfamilie in *Drosophila* zu identifizieren, wurden die Aminosäuresequenzen von Tao1, Tao2/PSK und JIK mit Protein-Datenbanken von *Drosophila* verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Dabei konnten mehrere im *Drosophila*-Genom codierte Proteine ermittelt werden, die eine homologe Sequenz aufwiesen. Bei den so identifizierten Proteinen handelte es sich ausschließlich um Kinasen. Anschließend wurden die Kinasedomänen der identifizierten Proteine zur Erstellung eines "Neighbour joining tree" (Thompson et al., 1994) verwendet.

Wie in Abbildung 2.9 A zu sehen ist, sind die Kinasedomänen verschiedener GCK hoch konserviert. Dies gilt nicht nur für die Vertreter innerhalb einer Spezies, sondern auch für den Vergleich der GCK zwischen den Spezies. Das von dem annotierten Gen *CG14217* codierte Protein kann der achten GCK-Unterfamilie zugeordnet werden (s. Abb. 2.9 B). Die von den annotierten Genen *CG5169*, *CG7097*, *CG11228* und *Misshapen (CG16973)* codierten Kinasedomänen hingegen lassen sich eindeutig anderen GCK-Unterfamilien zuordnen. Somit ist davon auszugehen, daß es sich bei dem von *CG14217* codierten Protein um den einzigen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie handelt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher das annotierte Gen *CG14217* als *D. melanogaster tao (tao)*, das codierte Protein als Tao bezeichnet.



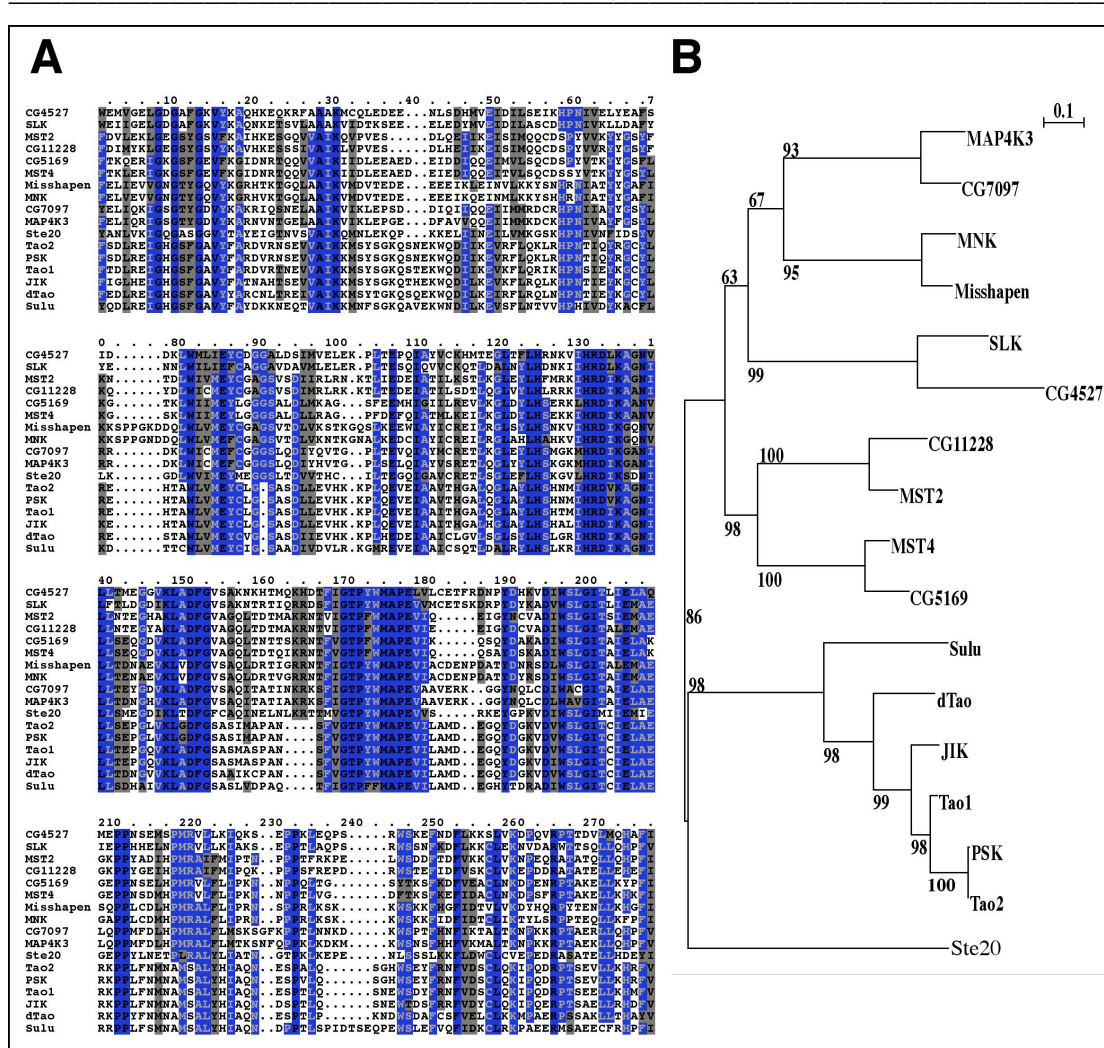


Abbildung 2.9: Aligierte Peptidsequenzen der Kinasedomänen verschiedener GCK sowie schematische Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen dieser Kinasen

(A) Sequenzvergleich der Kinasedomänen verschiedener Mitglieder der GCK aus Vertebraten, *C. elegans*, *S. cerevisiae* und *Drosophila*. Die vollständigen Sequenzen der im Sequenzabgleich verwendeten Proteine sind unter folgenden Zugangsnummern in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zu finden: *C. elegans*: NP\_741172 (Sulu); *D. melanogaster*: CG5169, CG4527, CG7097, CG11228, CG14217 (Tao) und CG16973 (Misshapen); *H. sapiens*: NP\_057235 (PSK), AAF\_14559 (JIK), NP\_003609: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP4K3), NP\_006272: Mammalian Ste20-like kinase 2 (MST2), AAK29620: Mammalian Ste20-like kinase 4 (MST4), NP\_733763: Misshapen/NIK-related kinase (MNK), CA112396: Ste20-related serine/threonin kinase (SLK); *R. norvegicus*: AAC71014: Tao1; AAD39480: Tao2; *S. cerevisiae*: AAA35039: Ste20. Identische und konservierte Aminosäuren sind blau unterlegt, wobei identische Aminosäuren durch einen schwarzen Buchstaben und konservierte Aminosäuren durch einen grauen Buchstaben gekennzeichnet sind. Ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt. (B) Stammbaum der Verwandtschaftsbeziehung verschiedener Kinasen. Mit den gezeigten



Peptidsequenzen wurde unter Verwendung des ClustalW-Service vom "European Bioinformatics Institute" (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) ein "Neighbour joining tree" erzeugt.

### 2.8 Der *tao*-Lokus

*tao* ist ein X-chromosomal codiertes Gen. Der *tao*-Lokus befindet sich nahe des Zentromers in Bande 18D des X-Chromosoms (s. Abb. 2.10 A). Der chromosomale Bereich, in dem *tao* liegt, umfaßt ca. 13,5 kb des genomischen Klon AE003512. Das *tao*-Gen codiert für zwei Transkripte mit unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten (s. Abb. 2.10 B).

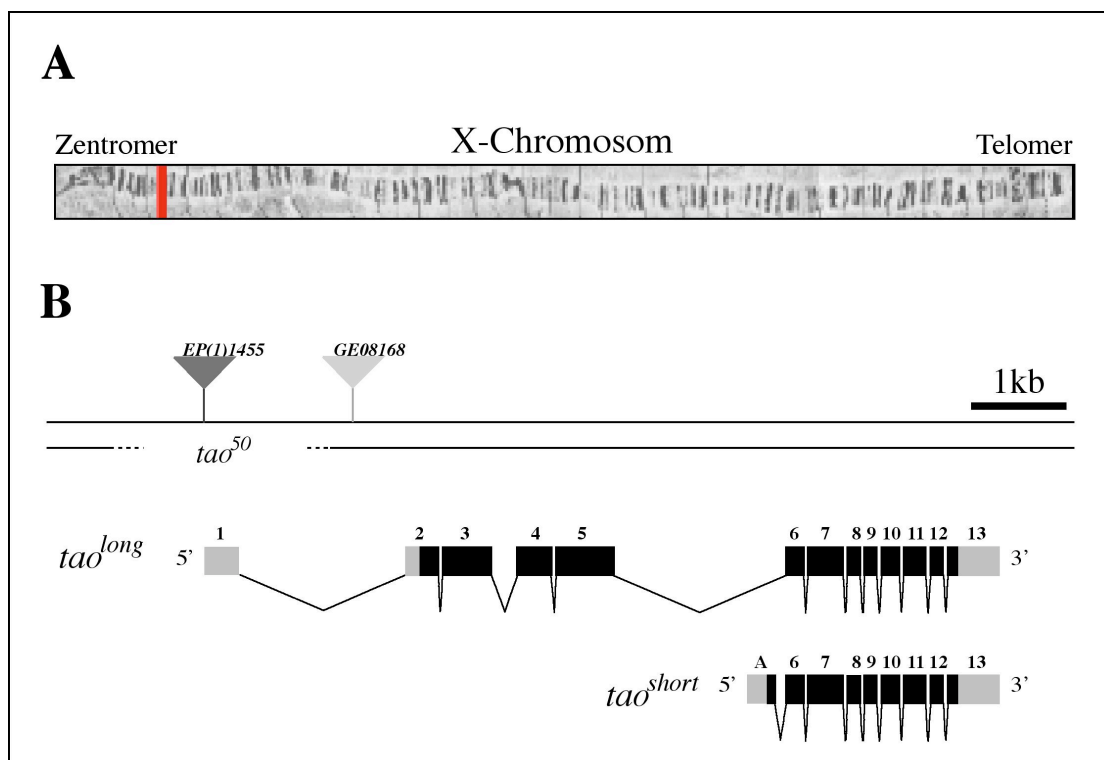


Abbildung 2.10: Lokalisation des *tao*-Lokus, schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur sowie Insertionsorte der transponierbaren Elemente *EP(1)1455* und *GE08168*

(A) Übersicht des X-Chromosoms von *Drosophila*. Der Bereich des X-Chromosoms, in dem sich der *tao*-Lokus befindet, ist gekennzeichnet (rot). (B) Gezeigt sind die genomische Organisation des *tao*-Lokus, die Insertionsorte der P-Elemente *EP(1)1455* und *GE08168*, sowie die durch Remobilisierung von *EP(1)1455* erzeugte Deletionsmutante *tao<sup>50</sup>*. In bezug auf den Transkriptionsstartpunkt von *tao<sup>long</sup>* wurden in 5'-Richtung ca. 1000 bp, in 3'-Richtung ca. 1360 bp deletiert. Die Exon-Intron-Struktur der Transkripte *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* ist angegeben. Untranslatierte Bereiche beider Transkripte sind grau, codierende Bereiche schwarz dargestellt.

Die zwei Transkripte des *tao*-Lokus *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* bestehen aus 13 bzw. neun Exons, wobei beide Transkripte die Exons sechs bis 13 beinhalten (s. Abb. 2.10 B). *tao<sup>long</sup>* entspricht einem Transkript von 4028 bp, der ORF umfaßt 3117 bp. Die Translation des ORFs von *tao<sup>long</sup>* würde ein Protein von 1039 Aminosäuren ergeben. *tao<sup>short</sup>* entspricht einem Transkript von 2106 bp. Die Transkription beginnt in dem für *tao<sup>short</sup>* spezifischen alternativen Exon, in welchem auch der Translationsstart des von *tao<sup>short</sup>* codierten Proteins zu finden ist. Das von *tao<sup>short</sup>* codierte Protein besteht aus 583 Aminosäuren, wobei die ersten 21 Aminosäuren von dem für *tao<sup>short</sup>* spezifischen Exon codiert werden (s. Abb. 2.10 B). Da die Tao-Kinasedomäne von den Exons 2-4 codiert wird, fehlt dem *tao<sup>short</sup>*-Protein die Kinasedomäne.

### 2.9 Charakterisierung ausgewählter *tao*-Allele

Innerhalb des *tao*-Lokus konnte eine Vielzahl von P-Elementinsertionen identifiziert werden (Flybase, Version 3.1; GenExel, Inc.). Die für diese Arbeit relevanten Insertionen sind in Abbildung 2.10 dargestellt. Der Insertionsort des EP-Elements *EP(1)1455* (Rorth, 1996) befindet sich im ersten Exon von *tao<sup>long</sup>*. Das transponierbare Element *GE08168* (GenExel, Inc.) ist im ersten Intron von *tao<sup>long</sup>* inseriert, wobei die Insertion 575 bp 3' des Transkriptionsstarts von *tao<sup>long</sup>* erfolgte. Homozygote *tao<sup>EP(1)1455</sup>*-Fliegenweibchen sind vital und fertil; gleiches gilt für hemizygote Männchen. Im Gegensatz dazu sind hemizygote *tao<sup>GE08168</sup>*-Männchen semiletal, d.h. bei 25°C überleben weniger als 1% aller männlichen Nachkommen. Diese sogenannten "Escaper" zeigen einen Paralyse-Phänotyp. Dieser äußert sich in unkontrolliertem Zucken der Beine. Kontrollierte Bewegungen konnten nicht beobachtet werden. Weiterhin weisen hemizygote *tao<sup>GE08168</sup>*-Männchen eine im Vergleich zum Wildtyp stark reduzierte Lebensspanne von wenigen Stunden auf.

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen der P-Element-Integration und dem letalen Phänotyp des Allels *tao<sup>GE08168</sup>* nachweisen zu können, wurden Remobilisierungsexperimente (Bellen et al., 1989) durchgeführt (s. Abschnitt

4.4.3). Es zeigte sich, daß durch die Remobilisierung des P-Elements der letale Phänotyp "geheilt" werden konnte, d.h. der letale Phänotyp korreliert mit der P-Element-Integration im *tao*-Gen (s. Abschnitt 2.1).

### 2.10 Erzeugung von Deletionsmutanten des *tao*-Lokus

Für den Bereich des X-Chromosoms, in dem der *tao*-Lokus lokalisiert ist, sind weder Duplikationen noch Defizienzen beschrieben. Somit konnte eine weiterführende genetische Analyse des Allels *tao*<sup>GE08168</sup> nicht durchgeführt werden. Daher wurde der Versuch unternommen, über Remobilisierungsexperimente mit der Insertionslinie *EP(1)1455* weitere *tao*-Allele zu generieren. Dabei wurde wie unter Abschnitt 4.4.4 beschrieben vorgegangen. Die mutmaßlichen *tao*-Allele *tao*<sup>50</sup>, *tao*<sup>51</sup>, *tao*<sup>69</sup>, *tao*<sup>231</sup> und *tao*<sup>ts</sup> wurden genetisch und molekular charakterisiert.

Eines der durch Remobilisierung erzeugten Allele ist das temperatursensitive Allel *tao*<sup>ts</sup>. Bei Temperaturen zwischen 25°C und 29°C können keine hemizygoten *tao*<sup>ts</sup>-Männchen erhalten werden. *tao*<sup>ts</sup>-hemizygote Männchen treten bei einer Temperatur von 22°C auf. Diese sind jedoch steril. Bei einer Temperatur von 18°C sind *tao*<sup>ts</sup>-hemizygote Männchen sogar fertil. Wurden diese Männchen mit *tao*<sup>ts</sup>-heterozygoten Weibchen verpaart, konnten in der Folgegeneration *tao*<sup>ts</sup>-homozygote Weibchen erhalten werden. Wie sich zeigte, waren *tao*<sup>ts</sup>-homozygote Weibchen nur bedingt fertil. Sowohl die Vitalität als auch die Fertilität *tao*<sup>ts</sup>-homozygoter Weibchen ist von der Temperatur abhängig. Bei einer Temperatur von 18°C ist es möglich, eine homozygote *tao*<sup>ts</sup>-Fliegenlinie zu etablieren. Bei Temperaturen zwischen 22°C und 29°C sind *tao*<sup>ts</sup>-homozygote Weibchen steril.

Die bei einer Temperatur von 18°C erhaltenen *tao*<sup>ts</sup>-hemizygoten Männchen konnten zur Komplementationsanalyse letaler "Jump-out"-Allele genutzt werden. Bei einer Temperatur von 18°C komplementiert das temperatursensitive Allel *tao*<sup>ts</sup> alle getesteten Allele. Eine Temperaturerhöhung von 18°C auf 25°C hat zur Folge, daß die letalen Allele *tao*<sup>50</sup>, *tao*<sup>51</sup>, *tao*<sup>69</sup> und *tao*<sup>231</sup> durch *tao*<sup>ts</sup> nicht komplementiert werden.

Temperatur Allel	18 °C	25 °C
<i>tao</i> <sup>50</sup>	+	-
<i>tao</i> <sup>51</sup>	+	-
<i>tao</i> <sup>69</sup>	+	-
<i>tao</i> <sup>231</sup>	+	-
<i>EP(1)1455</i>	+	+
<i>GE08168</i>	+	+

Tabelle 2: Komplementationsanalyse verschiedener *tao*-Allele

Die Allele *tao*<sup>50</sup>, *tao*<sup>51</sup>, *tao*<sup>69</sup>, *tao*<sup>231</sup>, *EP(1)1455* und *GE08168* wurden mit *tao*<sup>ts</sup>-hemizygoten Männchen bei 18°C verpaart. Nach 24 h wurden die Kreuzungen entweder weiterhin bei 18°C, oder bei 25°C inkubiert. In der F1-Generation wurde nach Individuen gesucht welche transheterozygot für die unterschiedlichen *tao*-Allele waren. (+) Es konnten für *tao*<sup>ts</sup> und die zu testenden Allele transheterozygote Individuen erhalten werden; (-) transheterozygote Individuen konnten nicht erhalten werden.

Somit stellen die Allele *tao*<sup>50</sup>, *tao*<sup>51</sup>, *tao*<sup>69</sup>, *tao*<sup>231</sup> und *tao*<sup>ts</sup> eine Komplementationsgruppe dar. Das semiletale Allel *tao*<sup>GE08168</sup> ist in diesem Zusammenhang eine Ausnahme, da dieses Allel auch bei einer Temperatur von 25°C *tao*<sup>ts</sup> komplementiert. Es handelt sich bei dem Allel *tao*<sup>GE08168</sup> mutmaßlich um ein schwaches hypomorphes *tao*-Allel.

Drei der hier aufgelisteten letalen Allele wurden molekular charakterisiert. Im Fall des Allels *tao*<sup>50</sup> konnte eine Deletion des ersten Exons von *tao*<sup>long</sup> ermittelt werden (s. Abb. 2.10). *tao*<sup>231</sup> repräsentiert eine große Deletion, welche neben dem *tao*-Lokus noch das benachbarte Gen *carnation* (*car*) deletiert. Veränderungen der genomischen Bereiche, welche dem Insertionsort von *EP(1)1455* benachbart sind, konnten im Fall des Allels *tao*<sup>ts</sup> nicht festgestellt werden. Allerdings sind interne Bereiche des transponierbaren Elements deletiert, wobei die für die Insertion des Elements notwendigen "inverted repeats" noch nachweisbar sind. Durch die internen Deletionen des transponierbaren Elements *EP(1)1455* werden Veränderungen weder im ORF des *tao*-Gens noch in dessen regulatorischen Sequenzen verursacht. Somit

kann über die molekularen Sachverhalte, welche der Mutation *tao<sup>ts</sup>* zugrunde liegen, keine Aussage getroffen werden.

### **2.11 Revertierung des letalen Phänotyps *tao*-mutanter Individuen durch eine transgen-abhängige Duplikation des *tao*-Lokus**

Um eine Revertierung des letalen Phänotyps der verschiedenen *tao*-Allele zur Vitalität zu erreichen, wurde ein genomisches DNA-Fragment, das den gesamten *tao*-Lokus und umgebende Sequenzen enthält, kloniert. In dem Konstrukt sind ca. 5 kb "stromaufwärts" und ca. 3 kb "stromabwärts" vom *tao*-Gen befindliche genomische Sequenzen enthalten, die jedoch keine codierenden Sequenzen anderer Gene enthalten. Dieses Konstrukt wurde mit Hilfe der Keimbahntransformation (Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982) stabil in das Genom integriert. Im weiteren Verlauf wird das beschriebene Transgen als "*tao*-rescue" (*tao*-res) bezeichnet. Für hemizygote Individuen der *tao*-Allele *tao<sup>50</sup>*, *tao<sup>51</sup>*, *tao<sup>69</sup>*, *tao<sup>GE08168</sup>* und *tao<sup>ts</sup>* konnte bei einer Temperatur von 25°C eine späte larvale oder pupale Letalität ermittelt werden. Hingegen sind für diese Allele hemizygote Individuen, die gleichzeitig das Transgen *tao*-res im Genom aufweisen, vital. Im Fall des Allels *tao<sup>231</sup>* war dies nicht zu beobachten. Die Deletion *tao<sup>231</sup>* entfernt die ORFs von mindestens zwei Genen, *tao* und *car*. Bei *car* handelt es sich um ein essentielles Gen, somit sind Mutationen in *car* letal. Eine Reversion des letalen Phänotyps von *tao<sup>231</sup>* zur Vitalität durch *tao*-res war daher nicht zu erwarten, da *tao*-res nur Sequenzen des *tao*-Lokus, nicht aber des Gens *car* enthält.

Durch eine Kopie des Konstrukts *tao*-res kann der letale Phänotyp der Allele *tao<sup>50</sup>*, *tao<sup>51</sup>*, *tao<sup>69</sup>*, *tao<sup>GE08168</sup>* und *tao<sup>ts</sup>* zur Vitalität revertiert werden. Darüber hinaus stellen die Allele *tao<sup>50</sup>*, *tao<sup>51</sup>*, *tao<sup>69</sup>* und *tao<sup>ts</sup>* eine Komplementationsgruppe dar (s. Tab. 2). Somit kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Allelen *tao<sup>50</sup>*, *tao<sup>51</sup>*, *tao<sup>69</sup>*, *tao<sup>GE08168</sup>* und *tao<sup>ts</sup>* um mutante Allele des *tao*-Gens handelt.

## 2.12 Expression von *tao*

Zur Bestimmung der Expression von *tao* wurden Northern Blot-Analysen und RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimente (Tautz and Pfeifle, 1989) durchgeführt (s. Abschnitte 4.1.8, 4.1.9 und 4.2.5). Die im Northern Blot verwendete Sonde ist spezifisch für den 5'- und 3'-Bereich des Gens. So ist es möglich, die zwei unterschiedlichen Transkripte von *tao*, *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* detektierbar.

Zur Normalisierung der aufgetragenen RNA-Mengen wurde der Blot anschließend mit einer für das ribosomale Protein L9 (RP-L9) spezifischen Sonde hybridisiert.

Wie in Abbildung 2.11 zu erkennen ist, sind in RNA-Präparationen von Embryonen des synzytialen Blastoderms (0-3 h) und adulten Weibchen die beiden Transkripte mit hoher Abundanz nachweisbar. Auch in den späteren embryonalen Stadien (3-24 h) sind die Transkripte *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* zu detektieren. Die Transkriptmengen sind jedoch, verglichen mit denen aus frühen Embryonen, deutlich geringer. In den larvalen Stadien ist keines der beiden Transkripte zu detektieren. Es ist daher davon auszugehen, daß in Larven keine oder nur eine sehr schwache Expression von *tao* stattfindet. In RNA-Präparationen aus Puppen und adulten Männchen ist nur *tao<sup>long</sup>* detektierbar. Auch bei längerer Exposition des Blots konnte kein Signal für *tao<sup>short</sup>* detektiert werden (nicht gezeigt). Eine hohe Abundanz von *tao*-Transkripten in adulten Weibchen und Embryonen des synzytialen Blastoderms (0-3 h) läßt auf einen maternalen Beitrag des Transkripts schließen. Dies konnte mit Hilfe von RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimenten an Ovarien gezeigt werden (s. Abb. 2.12 A).

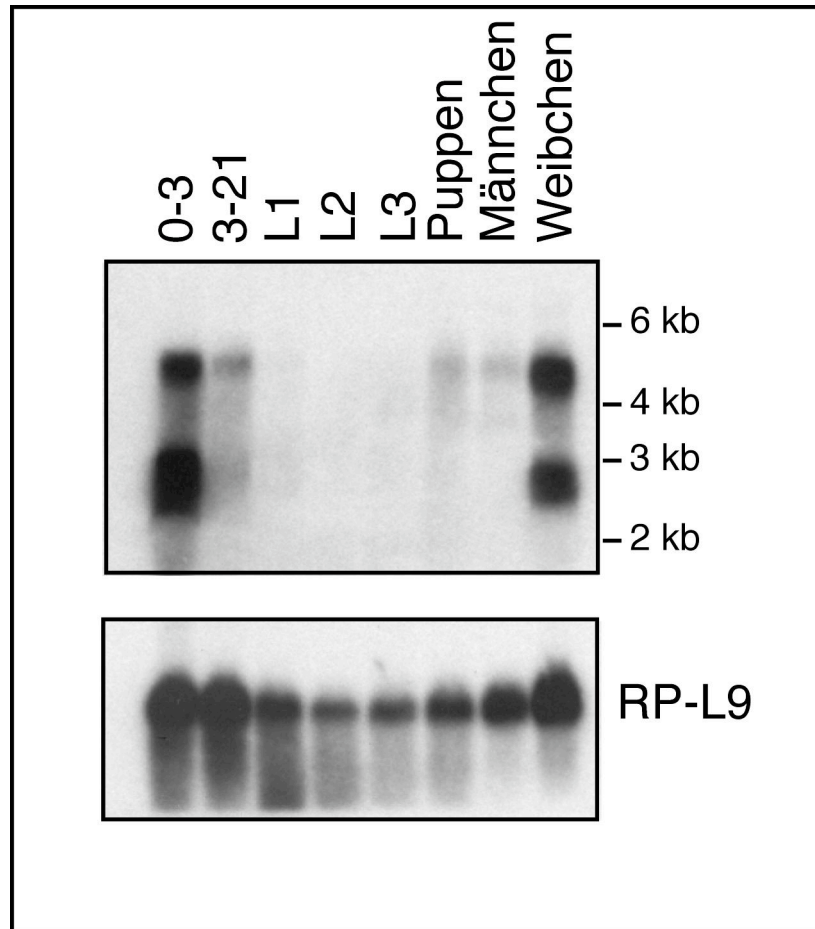


Abbildung 2.11: Analyse der *tao*-Expression durch Northern Blot

RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila* nach Hybridisierung eines Northern Blots. Es wurde eine für den 5'- und 3'-Bereich des *tao*-Gens spezifische Sonde verwendet. Diese hybridisiert mit den beiden Transkripten *tao*<sup>long</sup> und *tao*<sup>short</sup>. Sowohl präblastodermale Embryonen (0-3 h), als auch adulte Weibchen weisen eine hohe Abundanz an *tao*-Transkripten auf. In RNA-Präparationen aus späteren Stadien der Embryogenese (3-21 h) sind beide Transkripte nachweisbar. Die Menge an Transkript ist jedoch, verglichen mit der aus präblastodermalen Embryonen, deutlich geringerer. In RNA-Präparationen larvaler Stadien (L1-3) sind keine Transkripte nachweisbar. *tao*<sup>long</sup> ist mit geringer Abundanz in RNA-Präparationen aus Puppen und adulten Männchen nachweisbar.

Während der Oogenese sind *tao*-Transkripte in den Ovarien nachweisbar (s. Abb. 2.12 A). In den letzten Stadien der Oogenese werden die *tao*-Transkripte aus den Nährzellen in die Oozyte transportiert und sind noch im frühen transkriptionsinaktiven Embryo als maternaler Beitrag zu erkennen. Die *tao*-RNA ist ubiquitär im Embryo verteilt (s. Abb. 2.12 B).

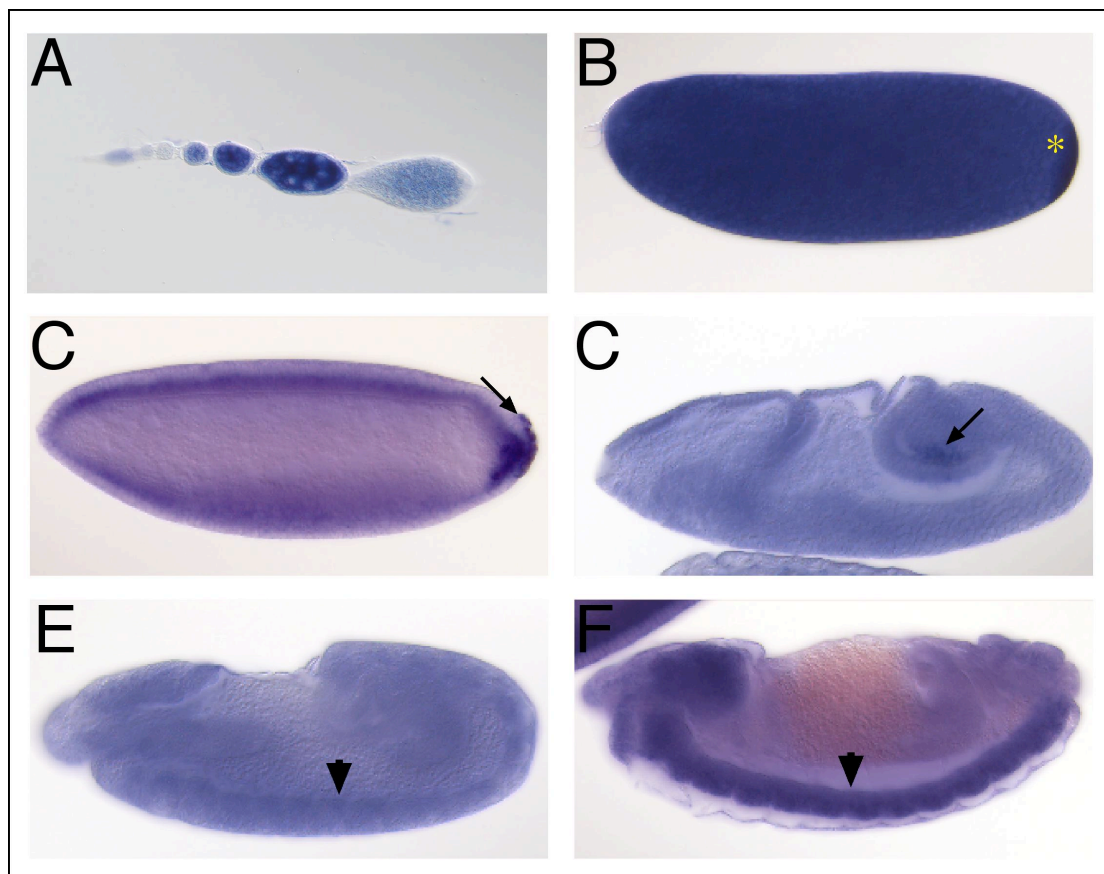


Abbildung 2.12: *in situ*-Expression von *tao*

RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimente an Präparationen verschiedener Stadien der Oogenese (A) und Embryogenese (B-F). (A) Ovariole mit Follikeln verschiedener Stadien. *tao*-Expression kann in allen Stadien der Oogenese nachgewiesen werden. Follikel akkumulieren mit zunehmenden Alter immer größere Mengen an Transkript. (B) Embryo direkt nach der Eiablage. Große Mengen an *tao*-Transkript sind ubiquitär im Embryo verteilt und akkumulieren am posterioren Pol (Stern). (C) Embryo im Stadium 6 der Embryogenese. Eine Abnahme der ubiquitär verteilten Transkripte ist mit Ausnahme des posterioren Pols und der Polzellen (Pfeil) zu beobachten. (D) Embryo im Stadium 8. Weitere Reduktion der ubiquitär verteilten Transkripte. In den primären Keimzellen (Pfeil), kann noch immer Transkript detektiert werden. Nach dem Durchwandern der Hinterdarms tasche ist in diesen Zellen kein Transkript mehr zu detektieren (nicht gezeigt). (E) Embryo des Stadium 12. Eine schwache ubiquitäre Färbung der *tao*-mRNA ist zu erkennen. Diese ist auch im weiteren Verlauf der Embryogenese zu sehen. Beginn der Akkumulation von Transkripten im zentralen Nervensystem (Pfeilspitze). (F) Embryo des Stadium 15. Neben der schwachen ubiquitären Expression von *tao* ist im zentralen Nervensystem eine starke Akkumulation von Transkripten zu erkennen (Pfeilspitze).



Bis zur Zellularisierung des Embryos hat bereits ein Abbau der ubiquitär verteilten Transkripte stattgefunden. Die *tao*-RNA am posterioren Pol scheint davon jedoch nicht betroffen zu sein (s. Abb. 2.12 C). Sowohl die Polzellen (primäre Keimzellen), als auch die darunterliegenden ektodermalen Zellen weisen noch immer große Mengen an Transkript auf (s. Abb. 2.12 D). Mit dem Beginn der Invagination des zukünftigen Hinterdarms sind Transkripte nur noch in den primären Keimzellen vorhanden. Nach der Migration der primären Keimzellen durch die Hinterdarmltasche (Stadium 11) ist eine Akkumulation von *tao*-Transkripten nicht mehr nachweisbar (s. Abb. 2.12 E). Im gesamten Verlauf der Embryogenese ist eine schwache ubiquitäre Expression von *tao* zu beobachten. Die Zellen des ZNS weisen jedoch ab dem Stadium 14 der Embryogenese eine stärkere Expression des *tao*-Gens auf. Mit zunehmender Differenzierung des ZNS nimmt die Akkumulation von *tao*-Transkripten in neuronalen Zellen zu (s. Abb. 2.12 F).

Die hier gezeigten *in situ*-Expressionsmuster konnten mit spezifischen Sonden für *tao<sup>long</sup>* bzw. *tao<sup>short</sup>* erhalten werden. Unterschiede zwischen der räumlichen und zeitlichen Expression beider *tao*-Transkripte konnten anhand von RNA-*in situ*-Hybridisierungsexperimenten nicht beobachtet werden. Auf *in situ*-Hybridisierungen an larvalen Geweben wurde verzichtet, da im Northern Blot keine *tao*-Expression in larvalen Stadien nachweisbar war.

### 2.13 Phänotypische Analyse des *tao<sup>ts</sup>*-Allels

Wie bereits erwähnt, konnte eine Fliegenlinie etabliert werden, die homozygot für das Allel *tao<sup>ts</sup>* ist. Sowohl Fertilität als auch Vitalität dieser Fliegenlinie ist temperaturabhängig. Bei einer Temperatur von 18°C sind die *tao<sup>ts</sup>*-homozygoten Weibchen vital und semisteril. Daher wurden die Ovarien dieser Weibchen präpariert und auf mögliche vom Wildtyp abweichende Phänotypen hin untersucht.

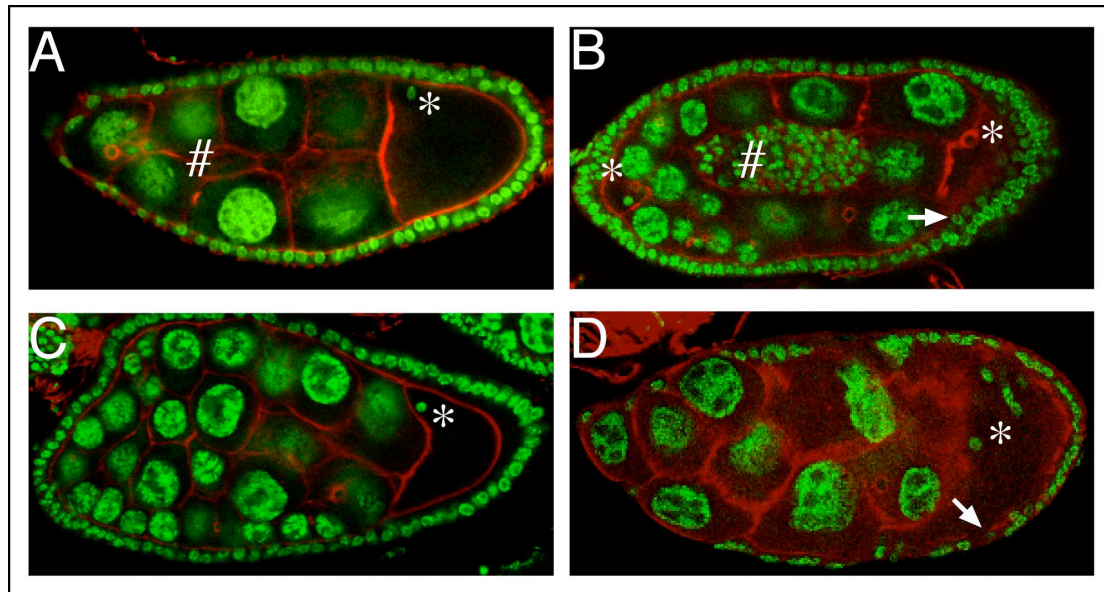


Abbildung 2.13: Zusammenfassung der verschiedenen Phänotypen *tao<sup>ts</sup>*-homozygoter Eifollikel

Eifollikel von Wildtyp (A) und *tao<sup>ts</sup>*-homozygoten Weibchen (B bis D). F-Actin ist in rot, DNA in grün dargestellt. Die Oozyte (Stern) und die "Border cells" (Parallelogramm) sind markiert. (A) Wildtyp-Eifollikel des neunten Stadiums. Im Vergleich zum Wildtyp weisen 80-100% der Eifollikel aus *tao<sup>ts</sup>*-homozygoten Weibchen abweichende Phänotypen auf. Die Phänotypen sind in ihrer Ausprägung variabel und betreffen unterschiedliche Aspekte der Oogenese. Eifollikel, die mehr als eine Oocyte enthalten, sind am häufigsten (> 70%) zu finden (B). Diese Eifollikel können durch Fusion oder Zellteilung entstehen. Das Verhältnis zwischen Oozyten und Nährzellen (1:15) bleibt dabei jedoch konstant (vgl. A und C). Auch die Zahl der "Border cells" ist in Eifollikeln aus *tao<sup>ts</sup>*-homozygoten Weibchen erhöht (vgl. A und B). Auch die Follikelzellen können einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp aufweisen. Die für Follikelzellen charakteristische epitheliale Anordnung ist teilweise gestört, so daß eine mehrschichtige Anordnung der Follikelzellen und/oder Löcher im Follikelzellepithel auftreten können (Pfeile in B und D). Dieser Phänotyp tritt jedoch weniger häufig auf und ist nur in ca. 50% der mutanten Follikel zu erkennen.

Wie in Abbildung 2.13 zu sehen ist, weisen einige Follikel aus *tao<sup>ts</sup>*-homozygoten Weibchen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Die auftretenden Phänotypen sind variabler Natur. So lassen sich in Ovariolen aus jungen *tao<sup>ts</sup>*-homozygoten Weibchen Follikel finden, welche dem Wildtyp entsprechen (s. Abb. 2.13 A). Dies war zu erwarten, da diese Weibchen bedingt fertil sind. Abhängig vom Alter der untersuchten Weibchen lassen sich Follikel identifizieren, in denen mehrere Oozyten vorhanden sind (s. Abb. 2.13

B). Mit steigendem Alter der untersuchten Weibchen steigt die Zahl der fusionierten Follikel. Das Verhältnis von Oozyten zu Nährzellen (1:15) bleibt in den Follikeln mit mehreren Oozyten jedoch erhalten, d.h. Follikel mit zwei Oozyten weisen 30 Nährzellen auf (s. Abb. 2.13 C).

Desweiteren konnten Phänotypen ermittelt werden, welche die sogenannten "Border cells" betreffen. Bei den "Border cells" handelt es sich um eine Subpopulation der Follikelzellen. Die meisten der ca. 1000 Follikelzellen wandern ab dem frühen Stadium neun über die Nährzellen nach posterior, nehmen eine kolumnare Form an und umschließen die Oozyte. Nur etwa 50 Follikelzellen bleiben zurück, flachen ab und bedecken die Nährzellen. Die "Border cells" bilden eine Ausnahme. Sie wandern nicht über die Nährzellen, sondern zwischen den Nährzellen hindurch (s. Abb. 2.13 A) hin zur Oozyte (Ribeiro et al., 2003; Starz-Gaiano and Montell, 2004). In Wildtyp-Follikeln beträgt die Zahl der "Border cells" zwischen sechs und zehn. In *tao<sup>ts</sup>*-mutanten Ovarien können teilweise deutlich mehr "Border cells" identifiziert werden (s. Abb 2.13 B).

Neben der größeren Zahl an "Border cells" erfolgt die Migration dieser Zellen in *tao<sup>ts</sup>*-mutanten Eifollikeln oftmals zeitlich verzögert (nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, umschließen die Follikelzellen den Ei-Nährzellverband normalerweise als einschichtiges Epithel. In Ovariolen aus *tao<sup>ts</sup>*-mutanten Tieren verlieren die Follikelzellen jedoch teilweise ihren epithelialen Charakter (s. Abb. 2.13 B und D). Aufgrund der Korrelation zwischen dem Alter der untersuchten Weibchen und der Ausprägung hier gezeigter Phänotypen wurden statistische Analysen nicht durchgeführt.

### 2.14 "Gain of function"-Analysen

Als nächstes wurde untersucht, ob die Überexpression von *tao* zu definierten Zeitpunkten während der Entwicklung zu einem vom Wildtyp abweichenden Phänotyp führt. Für diese Mißexpressionsstudien wurde das UAS/GAL4-System (Brand and Perrimon, 1993) verwendet. Dieses System erlaubt eine GAL4-abhängige Expression von Genen, die UAS-Bindestellen aufweisen.

Unter Verwendung von sogenannten Treibern, die eine räumlich und zeitlich spezifische Expression von GAL4 aufweisen, kann so eine GAL4-induzierte und UAS-abhängige Transkription, d.h. eine kontrollierte Mißexpression, erreicht werden.

EP-Elemente haben UAS-Bindestellen am 5'-Ende. Somit besteht die Möglichkeit, dem Insertionsort des EP-Elements benachbarte Sequenzen zu exprimieren (Rorth, 1996). Unter Verwendung von *EP(1)1455* kann eine gerichtete Expression von *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* erreicht werden (s. Abb 2.14 A). Um mögliche funktionale Unterschiede der Translationsprodukte von *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* ermitteln zu können, wurden "green fluorescent protein" (GFP)-markierte cDNA-Konstrukte von *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* in Expressionsvektoren kloniert und in das Genom von *Drosophila* integriert. Nach der Etablierung stabiler transgener Insertionslinien konnte somit eine UAS-abhängige Expression von *tao<sup>long</sup>* oder *tao<sup>short</sup>* erreicht werden. Da die jeweilige cDNA von *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* mit der codierenden Sequenz des GFP fusioniert war, konnte die Expression der jeweiligen Transgene anhand der Fluoreszenz des GFP-Markers nachgewiesen werden (s. Abb 2.14 B). Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendeten transgenen Linien zeigten, wie in Abbildung 2.14 B dargestellt, eine deutliche Expression des GFP-Markers.

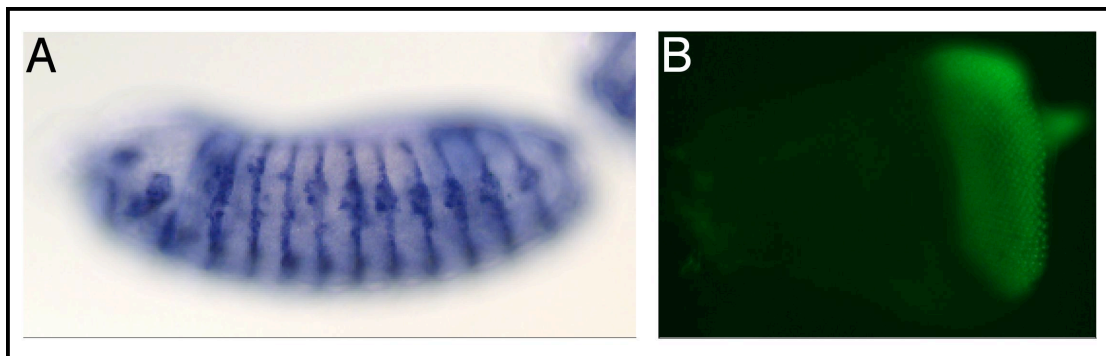


Abbildung 2.14: GAL4-abhängige Expression von *tao*

(A) RNA-*in situ*-Hybridisierungen an Embryonen. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Embryos des Genotyps: *EP(1)1455/+;en-GAL4/+*. Das hier gezeigte Expressionsmuster konnte mit transkriptspezifischen Sonden sowohl für *tao<sup>long</sup>* als auch *tao<sup>short</sup>* erhalten werden. (B) Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Augen-Imaginalscheibe des Genotyps: *UAS-tao<sup>long</sup>-GFP/elav-GAL4*.

Das Auge adulter Fliegen entwickelt sich aus der Augen-Imaginalscheibe, die bereits im Embryo angelegt ist, sich während der Larvenstadien entwickelt und in der Puppe ausdifferenziert. Das Komplexauge ist eine hoch organisierte Struktur, deren Organisationsgrad schon während der larvalen Stadien festgelegt wird. Störungen während der Augenentwicklung haben daher oftmals eine Auswirkung auf die adulten Strukturen (Thomas and Wassarman, 1999).

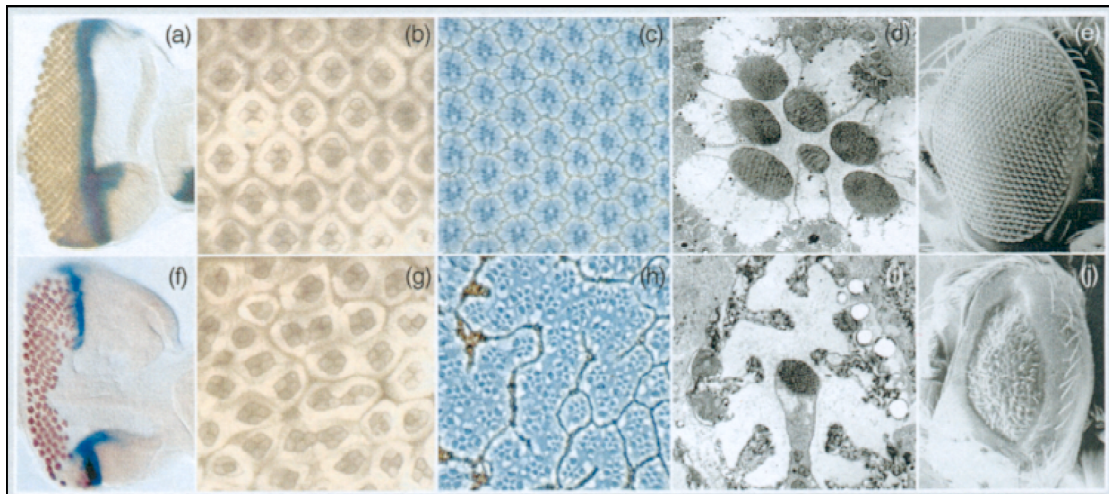


Abbildung 2.15 (aus Thomas and Wassarman, 1999): Phänotypische Anomalitäten in verschiedenen Stadien der Augenentwicklung von *Drosophila*

Dargestellt sind Verschiedene Stadien der Augenentwicklung von Wildtyp-Fliegen (a-e) und Beispiele für eine gestörte Augenentwicklung (f-j). Augen-Imaginalscheiben von Larven des dritten Stadiums (a, f). Die morphogenetische Furche (blau) und postmitotische Neuronen (braun) sind gefärbt. (b, g) Cobaltsulfid-Färbung pupaler Augen, welche die Zellgrenzen sichtbar macht. (c, h) Mit Giemsa gefärbte Tangentialschnitte adulter Augen. (d, i) Transmissionselektronen-mikroskopische Aufnahmen von Tangentialschnitten adulter Augen. (e, j) "Scanning electron micrographs" (SEM)-Aufnahmen von Augen adulter Fliegen.

Wie anhand der Abbildung 2.15 (Thomas and Wassarman, 1999) gut zu erkennen ist, können Störungen der Augenentwicklung von *Drosophila* schon während der larvalen (vgl. Abb. 2.15 a und f) und pupalen (vgl. Abb. 2.15 b und g) Stadien detektiert werden. Auch in Tangentialschnitten adulter Augen können die vom Wildtyp abweichenden morphologischen Unterschiede sowohl lichtmikroskopisch (vgl. Abb. 2.15 c und h) als auch elektronenmikroskopisch (vgl. Abb. 2.15 e und i) sichtbar gemacht werden. Eine gestörte Augenentwicklung ist letztlich und vergleichsweise einfach bei

adulten Fliegen sichtbar (vgl. Abb. 2.15 e und j). Da eine vom Wildtyp abweichende Morphologie adulter Augen leicht zu erkennen ist und es außer einem Stereomikroskop keiner weiteren Hilfsmittel bedarf, eignet sich die Augenentwicklung als experimentelles System für genetische Interaktionsstudien.

### **2.15 Genetische Interaktion zwischen Tao und dem JNK-Signaltransduktionsweg**

PSK und JIK stellen zwei der drei humanen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie dar (Dan et al., 2001). Sowohl PSK als auch JIK scheinen an der Regulation des JNK-Signaltransduktionswegs beteiligt zu sein (Tassi et al., 1999; Moore et al., 2000). PSK wirkt als Aktivator, JIK als Inhibitor des JNK-Signaltransduktionswegs (Tassi et al., 1999; Moore et al., 2000). Bei *Drosophila* wird die achte GCK-Unterfamilie nur durch Tao repräsentiert. Daher sollte untersucht werden, ob Tao eine Funktion im JNK-Signaltransduktionsweg von *Drosophila* ausübt. Um dies zu überprüfen, wurden genetische Interaktionsstudien durchgeführt.

Die Expression von Basket (Bsk), dem JNK-Homologen von *Drosophila*, in Photorezeptorneuronen hat in adulten Tieren einen milden sogenannten "Rauhe-Augen-Phänotyp" (RAP) zur Folge (Weber et al., 2000). Dieser Phänotyp wurde genutzt, um eine mögliche genetische Interaktion zwischen Tao und dem JNK-Signaltransduktionsweg zu untersuchen.

Die UAS-abhängige Expression von *tao* unter Verwendung eines *sev-GAL4*-Treibers (Weber et al., 2000) hat keine sichtbaren Auswirkungen auf die Augenmorphologie der adulten Fliegen. Dies gilt sowohl für die Expression von *tao<sup>long</sup>* und *tao<sup>short</sup>* unter Verwendung des transponierbaren Elements *EP(1)1455* als auch für die Expression von jeweils *tao<sup>long</sup>* oder *tao<sup>short</sup>* (nicht gezeigt). Die Expression von *bsk* unter Verwendung eines *sev-GAL4*-Treibers hingegen führt zu einem sehr schwachen RAP (s. Abb. 2.16 A, E).



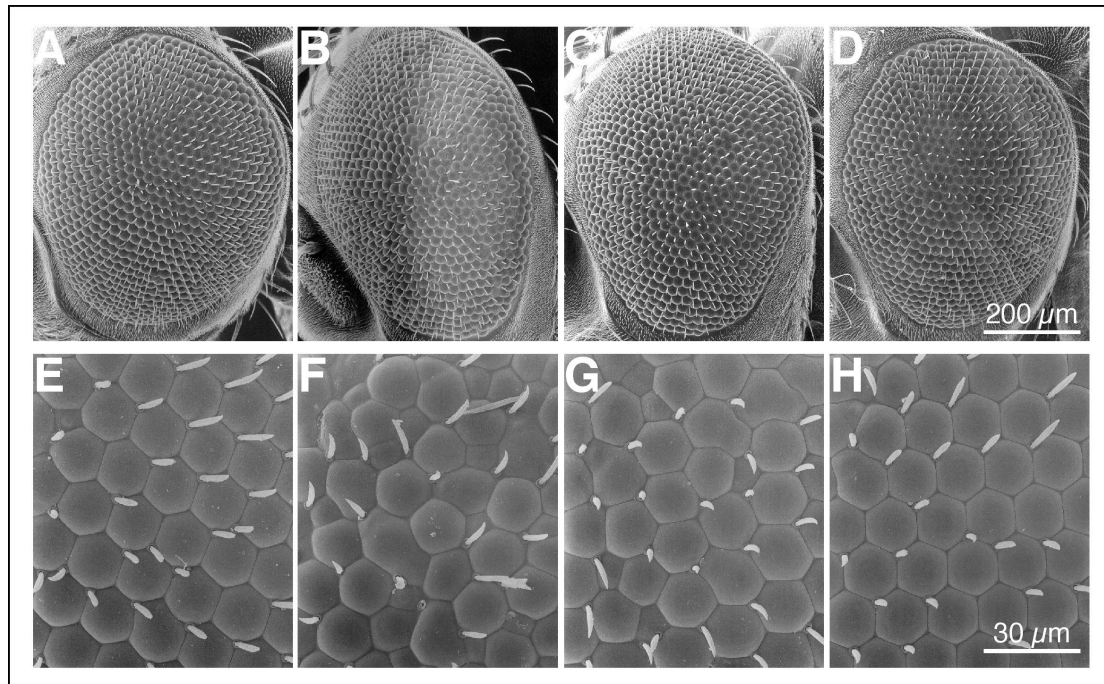


Abbildung 2.16: Verstärkung des RAP durch Co-Expression von *bsk* und *tao*

(A-H) SEM-Aufnahmen von Augen adulter Fliegen. Genotypen der adulten Fliegen: (A, E) *sev-GAL4,UAS-bsk/+*. (B, F) *EP(1)1455/+;sev-GAL4,UAS-bsk/+*. (C, G) *UAS-tao<sup>long</sup>/+;sev-GAL4,UAS-bsk/+*. (D, H) *UAS-tao<sup>short</sup>/sev-GAL4,UAS-bsk*. Größenstandard (weißer Balken) repräsentiert 150 µm (A-D) bzw. 30 µm (E-H). Die Vergrößerung ist 200x (A-D) bzw. 1000x (E-H).

Die Co-Expression von *basket* (*bsk*) und beider *tao*-Transkripte führt zu einem RAP, der deutlich stärker ausgeprägt ist als der durch alleinige *bsk*-Expression hervorgerufene Phänotyp (s. Abb. 2.16 B, F). Durch die Co-Expression von *tao<sup>long</sup>* und *bsk* kann der *bsk*-induzierte RAP verstärkt werden (s. Abb. 2.16 C, G). Werden jedoch *tao<sup>short</sup>* und *bsk* co-exprimiert, bewirkt dies keine Verstärkung (s. Abb. 2.16 D, H).

Aufgrund dieser genetischen Interaktionen ist eine Funktion von Tao bei der Vermittlung der JNK-Signaltransduktionsaktivität nicht ausgeschlossen. Da der Phänotyp, der durch *bsk*-Expression hervorgerufen wird nur durch die Co-Expression von *tao<sup>long</sup>* verstärkt wird, kann angenommen werden, daß für die Interaktion von Tao und einer oder mehrerer Komponenten des JNK-Signaltransduktionswegs die Kinase-Domäne von Tao obligat ist.

## 2.16 Tao im p38-Signaltransduktionsweg

Die Kinasen Tao1 und Tao2 aus *Rattus norvegicus* sind als Aktivatoren des p38-Signaltransduktionswegs beschrieben (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Chen et al., 2003). Es ist daher zu vermuten, daß auch *Drosophila*-Tao an der Regulation des p38-Signaltransduktionswegs beteiligt ist. In *Drosophila*, wie auch in Vertebraten, wird der p38-Signaltransduktionsweg durch umweltabhängige Streßfaktoren aktiviert. Zu diesen Faktoren gehören z.B. UV-Bestrahlung und Hitzeschock (Han et al., 1998). Die Aktivierung des p38-Signaltransduktionswegs führt zu einer Phosphorylierung der p38-MAPK, die mittels eines phosphospezifischen Antikörpers direkt nachgewiesen werden kann (Adachi-Yamada et al., 1999; Inoue et al., 2001). Unter Verwendung des phosphospezifischen p38-Antikörpers wurde untersucht, ob ektopische Expression von Tao zu einer Aktivierung von p38 führt.

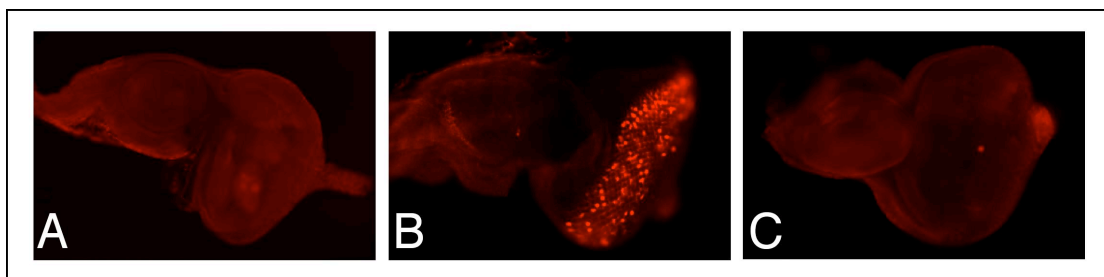


Abbildung 2.17: Effekt der Tao-Überexpression auf die p38-Aktivität

Gezeigt sind Augen-Imaginalscheiben aus Larven des dritten Stadiums (A-C). Doppelt phosphoryliertes und somit aktiviertes p38 wurde unter Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers nachgewiesen (rot). Genotypen: (A) *yw*. (B) *elav-GAL4/+;;UAS-mekk1/+*. (C) *elav-GAL4,EP(1)1455/+*.

In Augen-Imaginalscheiben aus *yw*-Larven des dritten Stadiums ist kein aktiviertes p38 nachweisbar (s. Abb. 2.17 A). *Drosophila*-MEKK1 ist als Aktivator des p38-Signaltransduktionswegs beschrieben (Inoue et al., 2001). Folglich sollte die Expression von *mekk1* zu einer Phosphorylierung und der einhergehenden Aktivierung von p38 führen. Wie in Abbildung 2.17 B zu sehen ist, führt die Expression von *mekk1* in postmitotischen neuronalen Zellen der Augen-Imaginalscheibe tatsächlich zu einer starken p38-Phosphorylierung. Die Expression von Tao im sich entwickelnden Auge



hingegen hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung von p38 (s. Abb. 2.17 C). Somit kann davon ausgegangen werden, daß Tao im sich entwickelnden Auge nicht an der Aktivierung von p38 beteiligt ist.

### 2.17 Genetische Interaktion von Tao und Par1

Wie von Timm und Mitarbeitern (2003) gezeigt werden konnte, aktiviert Tao1 die Kinase MARK/Par1. Um zu untersuchen, ob Tao bei *Drosophila* ebenfalls an der Aktivierung von Par1 beteiligt ist, wurden Mißexpressionsstudien durchgeführt. Die Expression von *par1* in Photorezeptorneuronen unter Verwendung der *sevenless-GAL4*-Treiberlinie hat den RAP zur Folge (Nishimura et al., 2004). Unter der Annahme, daß auch *Drosophila* Tao an der Aktivierung von Par1 beteiligt ist, sollte eine Co-Expression von *par1* und *tao* zu einer Verstärkung dieses Phänotyps führen. Die Co-Expression von *tao<sup>long</sup>* und *par1* resultiert in einer Verstärkung des Par1-abhängigen RAP (nicht gezeigt). Eine direkte Interaktion von MARK/Par1 und Tao1, wie sie bei Vertebraten gezeigt werden konnte, erscheint daher bei *Drosophila* wahrscheinlich. Auch in diesem Fall scheint die Kinaseaktivität von Tao obligat für die Verstärkung zu sein, da die Co-Expression von *tao<sup>short</sup>* und *par1* den Par1-induzierten RAP nicht verstärkt.

### 2.18 Genetische Interaktion zwischen Tau und Tao

Par1/MARK und JNK phosphorylieren das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau (MAPT) sowohl *in vitro* (Drewes et al., 1997; Jenkins and Johnson, 2000) als auch *in vivo* (Nishimura et al., 2004). Ferner ist der durch *par1*-Expression hervorgerufene RAP anscheinend auf eine abnormale Phosphorylierung von MAPT zurückzuführen (Nishimura et al., 2004). Hyperphosphoryliertes MAPT und seine Aggregation in "paired helical filaments" (PHF) sind Hauptbestandteil der "neurofibrillary tangles" (NF). Sowohl PHF als auch die daraus resultierenden NF sind Kennzeichen verschiedener neurodegenerativer Krankheiten. Da hyperphosphoryliertes MAPT und seine Aggregation in NF zu den charakteristischen Merkmalen dieser

neurodegenerativen Krankheiten zählt, werden sie unter dem Sammelbegriff "Tauopathien" zusammengefaßt. Zu diesen zählt neben dem bekanntesten Vertreter, der Alzheimer-Krankheit, auch die als "frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17" (FTDP-17) bezeichnete Krankheit. FTDP-17 ist auf Mutationen im *tau*-Gen zurückzuführen (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung von MAPT bei der Ausbildung von Tauopathien. Eine der Mutationen des *tau*-Gens, die mit FTDP-17 assoziiert sind, ist die Aminosäuresubstitution von Arginin (R) an Position 406 zu Tryptophan (W). Diese mutante Version des humanen MAPT wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als R406W bezeichnet.

Die transgenvermittelte Expression von R406W in Fliegen-Neuronen unter Verwendung des UAS-GAL4-Systems führt zu einer reduzierten Lebensdauer der Fliegen. Darüber hinaus weisen diese Fliegen viele Charakteristika humaner Tauopathien auf (Wittmann et al., 2001). Die Expression von R406W im sich entwickelnden Auge von *Drosophila* führt zu einem RAP in adulten Fliegen (s. Abb. 2.18 B). Wie kürzlich gezeigt werden konnte, phosphoryliert Par1 humanes MAPT *in vivo*, wenn beide Proteine während der Augenentwicklung von *Drosophila* co-exprimiert werden (Nishimura et al., 2004). Darüber hinaus konnte auch für die verschiedenen JNK der Vertebraten eine Beteiligung an der Phosphorylierung von MAPT nachgewiesen werden (Goedert et al., 1997; Reynolds et al., 1997; Yoshida et al., 2004). Daher sollte untersucht werden, ob Tao in *Drosophila* an der Regulation der MAPT-Phosphorylierung beteiligt ist.

Die Expression von Tao in postmitotischen neuronalen Zellen während der Augenentwicklung von *Drosophila* hat keine sichtbaren Effekte auf die Augenmorphologie adulter Fliegen (s. Abb. 2.18 A). Hingegen führt die Expression von R406W in diesen Zellen zu einem moderaten RAP (s. Abb. 2.18 B). Dieser Phänotyp kann durch Co-Expression von *tao* und R406W verstärkt werden (s. Abb. 2.18 C).

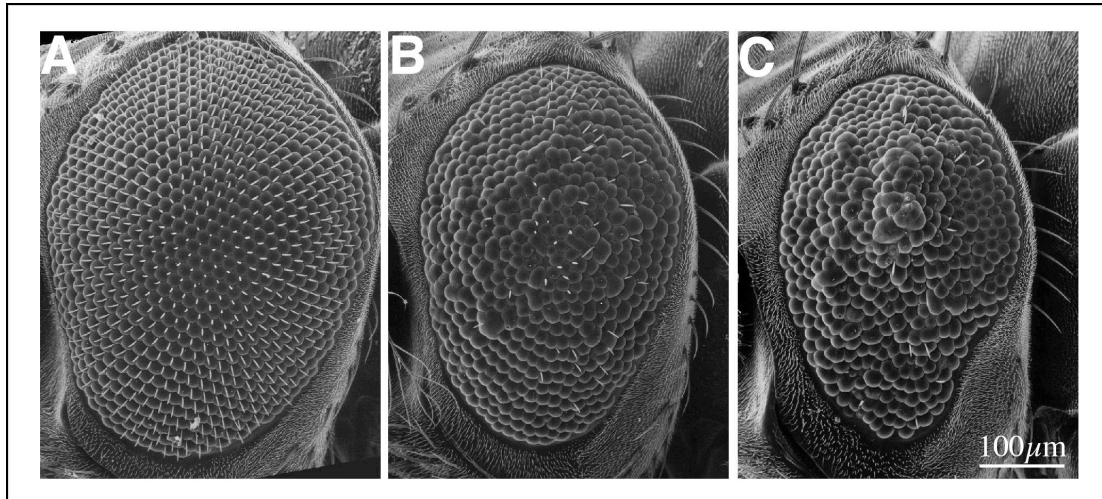


Abbildung 2.18: Augendegeneration durch Co-Expression von *R406W* und *tao*

Dargestellt sind Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Augen adulter Fliegen verschiedener Genotypen. (A) *elav-GAL4,EP(1)1455*. Eine vom Wildtyp abweichende Morphologie der Augenstruktur ist nicht zu erkennen. (B) *elav-GAL4/+;;R406W/+*. Moderater RAP. (C) *elav-GAL4,EP(1)1455/+;;R406W/+*. Starker RAP. Die Vergrößerung ist 150x, ein Größenstandard von 100 µm ist angegeben (A-C).

Ein RAP durch Expression von *R406W* kann unter Verwendung verschiedener Treiber erzeugt werden. Dabei war jedoch je nach Treiber ein unterschiedlich stark ausgeprägter RAP zu beobachten. Eine Verstärkung des induzierten Phänotyps durch Co-Expression von *tao* war jedoch mit allen getesteten Treibern möglich.

Wie in Abbildung 2.18 und 2.19 gezeigt, können durch die Expression von *R406W* während der Augenentwicklung RAP in adulten Fliegen erzeugt werden. Je nach verwendetem Treiber variiert der vom Wildtyp abweichende RAP (vgl. Abb. 2.18 B und 2.19 A). Eine Verstärkung des RAP durch die *EP(1)1455* vermittelte Co-Expression von *tao* möglich (vgl. Abb. 2.18 C und 2.19 B). Diese Verstärkung scheint spezifisch durch *tao<sup>long</sup>* hervorgerufen zu werden, da nur die Co-Expression von *tao<sup>long</sup>* und *R406W* zu einer Verstärkung des *R406W*-induzierten Phänotyps führt (s. Abb. 2.19 C). Durch die Co-Expression von *tao<sup>short</sup>* und *R406W* ist keine solche Verstärkung des Phänotyps zu beobachten (s. Abb. 2.19 D).

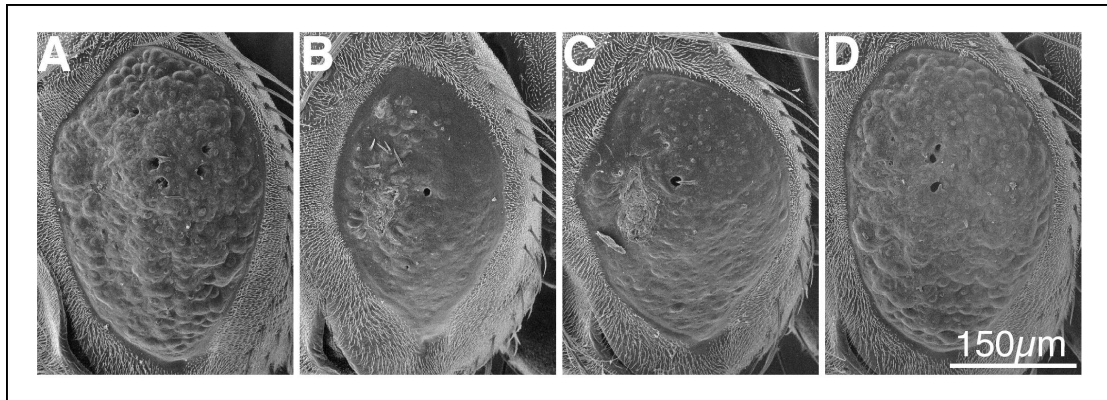


Abbildung 2.19: Effekte der Co-Expression von *R406W* und *tao* auf die Morphologie adulter Augen

(A-D) SEM-Aufnahmen adulter Komplexaugen, die eine vom Wildtyp abweichende Morphologie aufweisen. Die *R406W*-expressionsabhängigen Phänotypen wurden unter Verwendung des *GMR-GAL4* Treibers induziert. (A) Induktion eines starken RAP durch Expression von *R406W*. (B) Eine Verstärkung des in A gezeigten Phänotyps durch Co-Expression beider Transkripte von *tao* unter Verwendung des transponierbaren Elements *EP(1)1455* ist erkennbar. (C) Die Co-Expression von *tao<sup>long</sup>* und *R406W* resultiert ebenfalls in einer Verstärkung des in A gezeigten Phänotyps. (D) Die Co-Expression von *tao<sup>short</sup>* und *R406W* hingegen ist mit dem in A gezeigten Phänotyp vergleichbar. Die gezeigten Genotypen sind: (A) *GMR-GAL4/+;R406W/+*. (B) *EP(1)1455/+;GMR-GAL4/+;R406W/+*. (C) *tao<sup>long</sup>/+; GMR-GAL4/+;R406W/+*. (D) *tao<sup>short</sup>/+; GMR-GAL4/+;R406W/+*. Die Vergrößerung ist 200x, ein Größenstandard von 150 µm ist angegeben (A-D).

Analog zu der genetischen Interaktion von Bsk und Tao ist anscheinend auch bei der genetischen Interaktion von *R406W* und Tao die Kinasedomäne von entscheidender Bedeutung, da in beiden Fällen eine Verstärkung des jeweiligen Phänotyps durch eine Co-Expression von Tao-long erreicht werden kann.

### 3. Diskussion

Die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse beschreiben die Identifikation der *troI*-Transkriptionseinheit, die für *Drosophila*-Perlecan codiert. Im folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse bewertet und eine mögliche Funktion von Perlecan bei der Regulation der Proliferation von Neuroblasten diskutiert.

#### 3.1 *troI* codiert *Drosophila*-Perlecan

Mit der Identifikation neuer *troI*-Allele, welche durch P-Elementmutagenese generiert wurden, war es mir möglich, die Transkriptionseinheit des *troI*-Lokus zu identifizieren. Daß es sich bei den Allelen *troI*<sup>G0023</sup>, *troI*<sup>G0271</sup> und *troI*<sup>G0374</sup> tatsächlich um neue Allele des *troI*-Lokus handelt, konnte durch mehrere Befunde gestützt werden. Zum einen ist die Insertion der entsprechenden P-Elemente für die Letalität verantwortlich, was durch Remobilisierungsexperimente gezeigt werden konnte. Zum anderen konnte der Insertionsort der jeweiligen P-Elemente in der Region 3A des X-Chromosoms lokalisiert werden, der Region, in welcher auch der *troI*-Lokus kartiert ist (Judd et al., 1972; Datta and Kankel, 1992; Flybase, 1999). Darüber hinaus weisen *troI*<sup>G0023</sup>-, *troI*<sup>G0271</sup>- und *troI*<sup>G0374</sup>-mutante Individuen den für *troI*-Mutationen charakteristischen Phänotyp auf, d.h. eine Reduktion der optischen Loben larvaler Gehirne. Dies gilt auch für die von mir erzeugte Deletion (*troI*<sup>null</sup>), welche den gesamten *troI*-Lokus, jedoch keine codierenden Sequenzen weiterer Gene deletiert.

Anhand der exakten Lokalisation der P-Elementinsertionen im vollständig sequenzierten Genom konnte die Transkriptionseinheit des *troI*-Gens identifiziert werden. Mehrere Umstände deuten darauf hin, daß die von mir annotierte Transkriptionseinheit das *troI*-Gen repräsentiert. Erstens konnte in unmittelbarer Nachbarschaft der P-Elementinsertionen jeweils nur eine, die beschriebene Transkriptionseinheit identifiziert werden. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß durch die Insertion der P-Elemente eine Mutation dieser

Transkriptionseinheit hervorgerufen wurde. Zweitens konnte aufgrund der hohen Anzahl an *trol*-Allelen, welche durch chemische Agentien oder Röntgenstrahlen erzeugt wurden, davon ausgegangen werden, daß es sich im Fall von *trol* um einen großen Gen-Lokus handelt. Die von mir annotierte Transkriptionseinheit entspricht mit einer Gesamtlänge von mehr als 13 kb dieser Erwartung. Drittens konnte gezeigt werden, daß die *trol*-Allele *trol*<sup>p22</sup> und *trol*<sup>7</sup> Mutationen in der von mir als *trol*-Gen identifizierten Transkriptionseinheit aufweisen (Park et al., 2003). In beiden Fällen konnte eine Deletion nachgewiesen werden, welche eine Verschiebung des Leserasters der mRNA zur Folge hat. Dies führt nach der Translation der mutierten Sequenz schließlich zu Proteinen, die im Vergleich zum Wildtyp-Protein verkürzt sind (Park et al., 2003).

*trol* codiert ein zu den Perlecanen der Vertebraten homologes Protein (Friedrich et al., 2000; Voigt et al., 2002). Wie von mir gezeigt werden konnte, weist Trol eine Domänenstruktur auf, wie sie auch in Perlecan der Vertebraten zu finden ist (s. Abb. 2.2-2.5). Aufgrund der Homologie von Trol zu den Perlecanen der Vertebraten und der Tatsache, daß kein weiteres *Drosophila*-Protein mit ähnlicher Domänenstruktur zu identifizieren ist, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem von *trol* codierten Protein um das Orthologe der Perlecanen von Vertebraten handelt.

### **3.2 Perlecanen sind an der Regulation von Signaltransduktionsprozessen beteiligt**

Perlecan wurde ursprünglich als ein Protein der Basalmembranen identifiziert (Hassell et al., 1980; Noonan et al., 1991; Noonan and Hassell, 1993). Sowohl bei Vertebraten als auch bei *Drosophila* weisen Perlecanen Modifikationen durch Glycosaminoglycane (GAG) auf (Noonan et al., 1991; Friedrich et al., 2000). GAG bestehen aus unverzweigten, repetitiven Disacchariden, welche mit dem Protein über einen Serin-Rest verbunden sind. Je nach Zuckerresten, der Art ihrer Verbindung und der unterschiedlichen Sulfatierung, können verschiedene GAG unterschieden

werden: Chondroitin-/Dermatansulfat, Heparansulfat/Heparin und Keratansulfat (Kjellen and Lindahl, 1991). Obwohl die GAG nur aus Disacchariden bestehen, weisen sie jedoch einen hohen Grad an Diversität auf, da individuelle Zucker durch Sulfatierung, Epimerisierung und Deacetylierung modifiziert werden können (Kjellen and Lindahl, 1991).

Im Fall von Perlecan handelt es sich bei diesen GAG um Heparansulfat (HS) (Iozzo et al., 1994; Timpl, 1993). Aufgrund der Modifikation durch HS-Seitenketten kann Perlecan den Heparansulfat-Proteoglycanen (HSPG) zugeordnet werden. Studien an verschiedenen Modellorganismen belegen, daß HSPG an mehreren Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (Perrimon and Bernfield, 2000; Kramer and Yost, 2003; Lin, 2004). So konnte sowohl für Säuger (Lin et al., 2000), Amphibien (Brickman and Gerhart, 1994), Arthropoden (Lin, 2004) als auch für Nematoden (Morio et al., 2003) gezeigt werden, daß eine Ablation von HS-Seitenketten während der Embryogenese zu Gastrulationsdefekten führt.

Während der Entwicklung von *Drosophila* scheinen HSPG in unterschiedlichen Geweben an der Regulation verschiedener Signaltransduktionswege beteiligt zu sein. Zu diesen gehören die Wingless/Wnt-, “fibroblast growth factor” (FGF)-, “Decapentaplegic” (Dpp)- und “Hedgehog” (Hh)-Signaltransduktionswege (Perrimon and Bernfield, 2000; Toyoda et al., 2000; Lin and Perrimon, 1999; Lin, 2004).

Untersuchungen an Perlecanen der Vertebraten ergaben, daß Perlecan die Bindung von FGF an den FGF-Rezeptor begünstigen, was sowohl die Induktion der Mitose als auch die Bildung von Blutgefäßen stimuliert (Aviezer et al., 1994). Folglich kann auch im Fall von Trol von einer Funktion bei der FGF-Signaltransduktion ausgegangen werden (Voigt et al., 2002).

### **3.3 HSPG und Signaltransduktion bei *Drosophila***

Das Genom von *Drosophila* codiert vier HSPG. Neben Trol (Voigt et al., 2002) können noch Syndecan (Sdc) (Spring et al., 1994) sowie zwei Glypicane, “Division abnormally delayed” (*dly*) und “Dally-like” (*dlp*), identifiziert werden

(Khare and Baumgartner, 2000; Nakato et al., 1995). Während Perlecan extrazellulär vorliegen, stellen die Syndecane Transmembranproteine dar. Glypican hingegen sind über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker mit der Membran verbunden. Während die gleichzeitige Injektion doppelsträngiger RNA von *dly* und *dlp* zu embryonaler Letalität zu führen scheint, sind Mutationen in *sdc* embryonal semiletal (Baeg et al., 2001; Steigemann et al., 2004). Im Fall von *trol* kann jedoch keine embryonale Letalität festgestellt werden. Selbst Embryonen, die maternal und zygotisch keine Trol-Aktivität aufweisen, erreichen die larvalen Stadien (s. Abschnitt 2.6).

Wie bereits erwähnt, sind die HS-Seitenketten für die Funktion der HSPG von entscheidender Bedeutung. Mutationen in Genen, deren Translationsprodukte an der Synthese von HS-Seitenketten beteiligt sind, wurden in *Drosophila* eingehend untersucht (Lin, 2004). Je nach Gen und untersuchtem Gewebe treten in mutanten Individuen Phänotypen auf, die auf eine Involvierung der Translationsprodukte in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden schließen lassen. So führen z.B. Mutationen in den Genen “*sugarless*” (*sgl*) und “*sulfateless*” (*sfl*) zu embryonalen Kutikula-Phänotypen, wie sie von Mutationen in *wg* und *hh* bekannt sind (Binari et al., 1997; Häcker et al., 1997; Haerry et al., 1997; Lin and Perrimon, 1999). Eine Korrelation der Phänotypen, die bei einer Ablation der HS-Synthese entstehen, mit den Phänotypen, welche durch Mutationen in den HSPG zu beobachten sind, kann aufgrund fehlender Null-Mutationen für *sdc*, *dlp* und *dly* noch nicht eindeutig erbracht werden (Lin, 2004). Kontrovers diskutierte Daten deuten jedoch auf eine Regulation von *wg* und/oder *hh* durch *dlp* und/oder *dly* hin (Tsuda et al., 1999; Lin and Perrimon, 1999; Desbordes and Sanson, 2003; Perrimon and Häcker, 2004). Bei der Analyse von Individuen, die für das *trol<sup>null</sup>*-Allel hemizygot und für mutante *sgl*- bzw. *sfl*-Allele heterozygot waren, konnte von mir keine Verschiebung der Letalitätsphase beobachtet werden. Die Analyse von *trol<sup>null</sup>*-mutanten Klonen in Imaginalscheiben zeigt neben pleiotropen Effekten ebenfalls keine Phänotypen, die auf eine Beteiligung von Trol an Signaltransduktionsprozessen schließen lassen (Pizette, persönliche



Mitteilung). Daher scheint eine Beteiligung von *Trol* an Signaltransduktionsprozessen außerhalb der Regulation der Proliferation von Neuroblasten des larvalen Gehirns unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß ein Verlust der *Trol*-Aktivität durch redundant wirkende Proteine ersetzt wird. Aufgrund der fehlenden Nullmutationen für *dly*, *dlp* und *sdc* können diesbezügliche Analysen noch nicht durchgeführt werden.

### **3.4 Genetische Daten zur Regulation der Proliferation von Neuroblasten der optischen Loben**

*trol* und *ana* wurden bei der systematischen Suche nach Mutationen in Genen, welche die Entwicklung der optischen Loben beeinflussen, identifiziert (Datta and Kankel, 1992; Ebens et al., 1993). Gehirne aus *trol*-mutanten Larven weisen im Vergleich zum Wildtyp neben einer geringeren Gesamtgröße auch eine deutliche Reduktion der optischen Loben auf (Datta and Kankel, 1992). Dieser Phänotyp ist auf eine fehlende Reaktivierung der Proliferation von Neuroblasten der optischen Lobusanlage zurückzuführen (Datta, 1995). Die Repression der Proliferation von Neuroblasten der optischen Loben wird anscheinend von dem sezernierten Glycoprotein Ana vermittelt (Ebens et al., 1993). In Gehirnen *ana*-mutanter Larven ist eine verfrühte Proliferationsaktivität dieser Neuroblasten zu erkennen. Das Primordium der optischen Loben von *ana*-mutanten Larven ist jedoch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Daher ist erstens anzunehmen, daß Mutationen in *ana* keine Auswirkungen auf die embryonale Proliferation von Neuroblasten der optischen Loben haben. Zweitens kann eine Beteiligung von Ana an der Initiation des Proliferationsarrestes ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint Ana nur für die Aufrechterhaltung des Proliferationsarrestes verantwortlich zu sein (Ebens et al., 1993).

Die Analyse von Doppelmutanten für *ana* und *trol* ergab, daß in larvalen Gehirnen die Neuroblasten der optischen Loben verfrüht mit der Proliferation beginnen (Datta, 1995). Dieser Befund impliziert, daß *ana* epistatisch zu *trol* ist. Ferner kann angenommen werden, daß *trol* nur für die Reaktivierung der

Proliferation nötig ist. Haben die Neuroblasten der optischen Loben einmal mit der Proliferation begonnen, scheint keine *trol*-Aktivität mehr nötig zu sein. Außerdem scheint erst eine *ana*-abhängige Repression und dann eine *trol*-induzierte Aktivierung der Neuroblastenproliferation stattzufinden (Datta, 1995).

*ana*-mutante Individuen sind vital und fertil. Der optische Lobus adulter Tiere weist allerdings eine vom Wildtyp abweichende Organisation neuronaler Strukturen auf (Ebens et al., 1993). Im Gegensatz dazu stellen die von mir identifizierten *trol*-Allele Letalmutationen dar. Diese Beobachtung impliziert, daß *trol* außer der Regulation der Proliferation von Neuroblasten der optischen Loben noch weitere Funktionen während der Entwicklung hat. Bisher konnten jedoch nur pleiotrophe Effekte ermittelt werden, was anhand der polyphasischen Letalität *trol*-mutanter Individuen zu erwarten war.

Die Expression von *ana* in Gliazellen, die den Neuroblasten der optischen Loben benachbart sind, und die Sezernierung des Proteins, machen eine zellautonome Funktion von Ana unwahrscheinlich (Ebens et al., 1993). Gleiches gilt für das von *trol* codierte Protein, welches ebenfalls ein extrazelluläres Protein darstellt (Friedrich et al., 2000; Voigt et al., 2002). Eine zellautonome Funktion ist daher auch für Trol nicht anzunehmen. Wie gezeigt werden konnte, sind die *trol*-abhängigen Neuroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus (Lee and Orr-Weaver, 2003) arretiert, da der Proliferationsarrest durch die Expression von Cyclin E aufgehoben werden kann (Caldwell and Datta, 1998). Eine Regulation der Cyclin E-Expression durch Trol wurde ebenfalls postuliert, da die Cyclin E-Level *trol*-mutanter Larven im Vergleich zum Wildtyp geringer sind (Caldwell and Datta, 1998). Dieses Argument erscheint aufgrund der geringeren Anzahl an Neuroblasten in *trol*-mutanten Individuen, und somit einer geringeren Anzahl an Cyclin E exprimierenden Zellen, fragwürdig. Eine Regulation der Cyclin E-Expression könnte indirekt über Trol-abhängige Signaltransduktionsprozesse erreicht werden. Gleiches gilt für die Reversion des Proliferationsarrests *trol*-mutanter Individuen durch die Expression von *string* (*stg*). *stg* codiert eine Protein-Phosphatase, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Park et al., 2003b). Da Stg-Aktivität

für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus erforderlich ist, war analog zu den Ergebnissen der Cyclin E-Überexpression auch in diesem Fall eine Reversion des Proliferationsarrests zu erwarten. Eine zellautonome Wirkungsweise von Trol auf Stg kann auch hier ausgeschlossen werden. Somit ist eine Regulation von Stg durch Trol nur über Signaltransduktionsprozesse zu erreichen. In diesem Fall müßten Trol-abhängige Signaltransduktionsprozesse die Expression oder die Aktivität von Stg regulieren.

Die Beobachtung, daß Mutationen in *eve* den *tro<sup>p22</sup>*-Phänotyp verstärken, läßt vermuten, daß Eve für die Expression eines diffusiblen Signals benötigt wird, welches die Neuroblastenproliferation stimuliert (Park et al., 1998). Um was für ein Signal es sich hierbei handelt, ist jedoch nicht bekannt. Eine Beteiligung extrazellulärer, nicht zellautonom wirkender Signale ist aufgrund der extrazellulären Lokalisation von Trol wahrscheinlich. Auch der Umstand, daß Mutationen in *eve* den schwachen *tro<sup>p22</sup>*-Phänotyp verstärken, und diese Verstärkung durch das Hormon Ecdyson wieder normalisiert werden kann, ist als Beleg für die Beteiligung extrazellulärer Signale bei der Regulation der Neuroblastenproliferation anzusehen (Park et al., 2001). Weitergehende Untersuchungen bestätigen diese Vermutung. So konnte gezeigt werden, daß Mutationen in einem der beiden FGF-ähnlichen Signalmoleküle von *Drosophila* oder deren Rezeptor den *tro<sup>p22</sup>*-Phänotyp verstärken (Park et al., 2003). Darüber hinaus kann der Proliferationsarrest von Neuroblasten in *tro<sup>p22</sup>*-mutanten Gehirnen durch Zugabe von humanem FGF-2 aufgehoben, sowie eine direkte HS-abhängige Interaktion von Trol und FGF nachgewiesen werden (Park et al., 2003).

Hedgehog-Homologe aus Vertebraten und *Drosophila* beeinflussen die Teilung somatischer Stammzellen (Forbes et al., 1996; Ahlgren and Bronner-Fraser, 1999; Marcelle et al., 1999; Rowitch et al., 1999). Wie genetische und biochemische Untersuchungen zeigen, beeinflußt Trol die Hh-Signaltransduktion in *Drosophila* (Park et al., 2003). Analog zur Verstärkung des *tro<sup>p22</sup>*-Phänotyps durch Mutation in FGF kann der *tro<sup>p22</sup>*-Phänotyp auch durch Mutationen in *hh* verstärkt werden. Im Gegensatz zu der HS-

abhängigen Interaktion von FGF und Trol ist die Interaktion von Hh und Trol nicht von den HS-Seitenketten abhängig (Park et al., 2003).

Es ist daher wahrscheinlich, daß sowohl die FGF- als auch die Hh-Signaltransduktion an der Regulation der Proliferation von Neuroblasten der optischen Loben beteiligt sind und beide Signaltransduktionswege von Trol beeinflußt werden können. Weitergehende Untersuchungen bezüglich dieser Interaktionen stehen noch aus. Mit der Erzeugung einer Nullmutation des *trof*-Gens (Voigt et al., 2002) und der Möglichkeit, larvale Gehirne in Kultur beobachten zu können (Datta, 1995), sollten die Grundlagen für weitere Analysen geschaffen sein.

Im zweiten Teil der Diskussion stehen die Ergebnisse zur Funktionsanalyse der Tao-Kinase im Mittelpunkt. Dabei wird hauptsächlich der Frage nachgegangen, inwieweit Erkenntnisse, welche bei Untersuchungen der orthologen Kinasen der Vertebraten erhalten wurden, auf *Drosophila* übertragbar sind. Die Funktion dieser Kinasen der Vertebraten wurden bisher nur durch *in vitro* oder Zellkultur-Analysen ermittelt. Die im weiteren Verlauf diskutierten Ergebnisse hingegen sind das Resultat von *in vivo*-Untersuchungen auf organismer Ebene.

### **3.5 Die achte GCK-Unterfamilie der Vertebraten und *Drosophila***

Die Ste20-ähnlichen Kinasen werden bei Vertebraten in zwei Familien unterteilt: PAK und GCK. Diese unterscheiden sich durch die Position der Kinasedomäne innerhalb des Proteins, welche bei den PAK am C-Terminus, bei den GCK hingegen N-terminal lokalisiert ist. Aufgrund von Sequenzunterschieden innerhalb der Kinasedomänen können von den GCK noch Unterfamilien gebildet werden. Die Kinasen Tao1, Tao2/PSK und JIK, bilden die achte dieser GCK-Unterfamilien (Hutchison et al., 1998; Tassi et al., 1999; Chen et al., 1999; Moore et al., 2000; Dan et al., 2001). Für jede dieser Kinasen konnte eine Funktion im MAPK-Signaltransduktionsweg wahrscheinlich gemacht werden. Die Kinasen Tao1 und Tao2 der Ratte aktivieren spezifisch den p38-Signaltransduktionsweg, indem sie MKK3 und MKK6 aktivieren. Die aktivierten MKK3 und MKK6 katalysieren nun ihrerseits die Phosphorylierung der verschiedenen p38. Somit nehmen Tao1 und Tao2 in der hierarchischen Aktivierungskaskade eine MAPKKK-Funktion ein (Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Chen et al., 2003). Im Gegensatz zu den Kinasen aus *Rattus norvegicus* sind die bisher untersuchten humanen Kinasen PSK/Tao2 und JIK/Tao3 anscheinend nicht an der Regulation des p38-Signaltransduktionswegs beteiligt. Vielmehr konnte für diese beiden Kinasen eine Funktion im JNK-Signaltransduktionsweg nachgewiesen werden. PSK ist als ein Aktivator, JIK als Inhibitor des JNK-Signaltransduktionswegs beschrieben (Moore et al., 2000; Tassi et al., 1999). Auf welcher Stufe der

hierarchischen Kaskade der Regulation des JNK-Signaltransduktionswegs diese beiden Kinasen anzusiedeln sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es erscheint allerdings wahrscheinlich, daß PSK analog zu Tao1 und Tao2 eine MAPKKK-Funktion ausübt (Moore et al., 2000). Die JIK-Aktivität hingegen ist in der hierarchischen Aktivierungskaskade oberhalb der MAPKKK-Aktivität einzuordnen (Tassi et al., 1999).

Neben der Aktivierung des p38-Signaltransduktionswegs scheint die Kinase Tao1 aus *Rattus norvegicus* noch an der Regulation der MARK/Par1-Aktivität beteiligt zu sein (Timm et al., 2003). MARK und Par1 stellen Kinasen dar, welche an der Etablierung zellulärer Polarität beteiligt sind (Tassan and Le Goff, 2004). Sowohl bei Vertebraten als auch bei *Drosophila* scheinen MARK/Par1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine zu phosphorylieren und somit direkten Einfluß auf das Zytoskelett zu nehmen (Levin and Bishop, 1990; Drewes et al., 1995; Drewes et al., 1997; Illenberger et al., 1996; Nishimura et al., 2004). Zu den Substraten von MARK/Par1 gehört auch das Protein MAPT. Hyperphosphoryliertes MAPT und seine Aggregation sind Kennzeichen von Tauopathien. Findet eine Aktivierung von MARK/Par1 durch Tao1 statt, so ist anzunehmen, daß Tao1 an der Ausbildung von Tauopathien und deren progressiven Verlauf beteiligt ist (Timm et al., 2003). Eine Analyse zur Funktion der Tao1-Kinase auf organismischer Ebene im Hinblick auf eine mögliche Involvierung dieser Kinase in den angesprochenen Signaltransduktionskaskaden ist allerdings noch nicht durchgeführt worden. *Drosophila* ist als Modellorganismus in vielerlei Hinsicht für eine solche Untersuchung geeignet. Zum einen weist *Drosophila* im Gegensatz zu Vertebraten nur einen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie auf (s. Abschnitt 2.7). Dieser Umstand erleichtert die Funktionsanalyse der Kinase, da eine Redundanz durch weitere Kinasen der achten GCK-Unterfamilie ausgeschlossen werden kann. Zum anderen sind sowohl der MAPK-Signaltransduktionsweg als auch die Regulation des Zytoskeletts in *Drosophila* auf organismischer Ebene eingehend untersucht. Aufgrund der geringen Generationszeit und der etablierten Genetik eignet sich *Drosophila*

darüber hinaus für genetische Interaktionsstudien, was bei den Modellorganismen der Vertebraten nicht der Fall ist.

### 3.6 Phänotypische Analyse *tao*-mutanter Individuen

Der *tao*-Lokus codiert eine Ste20-ähnliche Kinase, welche den einzigen Vertreter der achten GCK-Unterfamilie von *Drosophila* repräsentiert (s. Abschnitt 2.7). Neben der identifizierten Kinase, Tao-long, codiert der *tao*-Lokus noch ein weiteres Protein, Tao-short. Bei Tao-short handelt es sich um eine verkürzte Variante von Tao-long. Während Tao-long am N-Terminus eine Kinasedomäne und C-terminal eine "coiled-coil"-Region aufweist, fehlt Tao-short die Kinasedomäne (s. Abschnitt 2.8).

Nach der Identifikation des *tao*-Lokus, wurden im Rahmen dieser Arbeit *tao*-Allele durch ungenaue Exzision des transponierbaren Elements *EP(1)1455* generiert (s. Abschnitt 2.10). Wie die phänotypischen Analysen mutanter Individuen der Allele *tao*<sup>50</sup>, *tao*<sup>51</sup>, *tao*<sup>69</sup> ergaben, sind diese letal. Daher kann davon ausgegangen werden, daß *tao* ein essentielles Gen darstellt. Der Beweis, daß die Letalität auf Mutationen im *tao*-Lokus zurückzuführen ist, konnte durch Komplementation verschiedener *tao*-Allele durch das Transgen *tao-res* erbracht werden. Eine Kopie des Transgens *tao-res*, welches neben dem ORF von *tao* keine codierenden Sequenzen anderer Gene enthält, komplementiert die letalen Allele *tao*<sup>50</sup>, *tao*<sup>51</sup>, *tao*<sup>69</sup> (s. Abschnitt 2.11).

Die Analysen des semiletalen Allels *tao*<sup>GE08168</sup> und des temperatursensitiven Allels *tao*<sup>ts</sup> lieferten erste Hinweise auf mögliche Funktionen der Translationsprodukte des *tao*-Lokus. *tao*<sup>GE08168</sup>-hemizygote Männchen sterben gewöhnlich als vollständig entwickelte adulte Tiere, welche jedoch die Puppenhüllen nicht verlassen. Lediglich <1% der hemizygoten Männchen schlüpfen. Diese Individuen weisen einen paralytischen Phänotyp auf, welcher das Resultat neuronaler Defekte sein könnte (s. Abschnitt 2.9). Die neuronale Expression von *tao* während der Embryogenese (s. Abschnitt 2.12) und die reduzierte Motilität *tao*-mutanter Larven können als weitere Hinweise auf eine neuronale Funktion von *tao* angesehen werden. Da das Transgen

*tao*-res auch das Allel *tao*<sup>GE08168</sup> komplementiert, ist davon auszugehen, daß die beobachteten Phänotypen durch die Insertion des transponierbaren Elements *GE08168* im *tao*-Lokus hervorgerufen werden.

Neben einer möglichen neuronalen Funktion von *tao* ergab die Analyse *tao*<sup>ts</sup>-homozygoter Weibchen, daß Tao-Aktivität anscheinend während der Oogenese notwendig ist. Die Ovarien *tao*<sup>ts</sup>-homozygoter Weibchen weisen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf, wobei die Ausprägung des Phänotyps von der Temperatur abhängig ist. Zusätzlich zu einer vom Wildtyp abweichenden Anzahl von Nährzellen und Oozyten in Eifollikeln aus *tao*<sup>ts</sup>-mutanten Weibchen, kann auch ein Verlust des epithelialen Charakters der Follikelzellen beobachtet werden (s. Abschnitt 2.13). Eine direkte Korrelation zwischen den beschriebenen Phänotypen und Mutationen in *tao* konnten allerdings noch nicht nachgewiesen werden. Für einen direkten Zusammenhang der Oogenese-Phänotypen mit dem Allel *tao*<sup>ts</sup> spricht die Tatsache, daß eine Kopie des Transgens *tao*-res ausreichend ist, um bei einer Temperatur von 25°C *tao*<sup>ts</sup>-homozygote Weibchen zu erhalten, die darüber hinaus fertil sind.

Eine weitere mögliche Erklärung für diesen Phänotyp könnten auch sogenannte "second site"-Mutationen sein. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, daß der Oogenese-Phänotyp nur in Ovarien von *tao*<sup>ts</sup>-homozygoten Weibchen auftritt. In transheterozygoten Weibchen, welche das Allel *tao*<sup>ts</sup> in Kombination mit einem der letalen *tao*-Allele aufweisen, ist dieser Phänotyp nicht erkennbar. Eine detaillierte Analyse dieses Sachverhalts ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

### 3.7 Regulation des MAPK-Signaltransduktionswegs durch Tao

Wie bereits erwähnt, sind die Tao-Homologen der Vertebraten an der Regulation des MAPK-Signaltransduktionswegs beteiligt (Tassi et al., 1999; Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Moore et al., 2000). PSK und JIK sind als spezifische Regulatoren des JNK-Signaltransduktionswegs beschrieben. Das sich entwickelnde Auge von *Drosophila* ist empfindlich



gegenüber Schwankungen in der JNK-Aktivität. Sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduzierung der endogenen JNK-Aktivität können zu einem RAP führen (Weber et al., 2000). Durch die Expression von Bsk, dem JNK-Homologen von *Drosophila*, kann eine Erhöhung der endogenen Aktivität des JNK-Signaltransduktionswegs simuliert werden (Weber et al., 2000). Dies führt zu einem milden RAP, welcher sich durch Co-Expression von Tao verstärken läßt. Da die alleinige Expression von Tao keinen RAP zur Folge hat, ist Tao als schwacher Aktivator des JNK-Signaltransduktionswegs anzusehen. Desweiteren ist durch diesen Befund eine deutliche Inhibition des JNK-Signaltransduktionswegs durch Tao als Ursache für einen RAP ausgeschlossen. Die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionswegs ist auf Tao-long beschränkt (s. Abschnitt 2.15). Da Tao-long im Gegensatz zu Tao-short eine Kinasedomäne aufweist, kann angenommen werden, daß die Kinaseaktivität von Tao-long für die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionswegs obligat ist. Diese Annahme setzt allerdings voraus, daß Tao-long zumindest teilweise als aktive Kinase vorliegt. Inwieweit die Kinaseaktivität von Tao-long durch Autophosphorylierung erreicht wird, oder das Resultat der Phosphorylierung durch hierarchisch übergeordnete Kinasen ist, wurde bisher nicht untersucht. Eine Autophosphorylierung ist jedoch wahrscheinlich, da bei den Tao-homologen Kinasen der Vertebraten eine Aktivierung durch Autophosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Tassi et al., 1999; Hutchison et al., 1998; Chen et al., 1999; Moore et al., 2000).

Bei dem hier verwendeten "Assay"-System, dem Bsk-induzierten RAP, handelt es sich um ein sehr sensitives System. Die ermittelten Effekte auf die Augenmorphologie durch die Co-Expression von Tao-long und Bsk hingegen sind im Vergleich zu anderen Interaktionen eher gering. So ist z.B. die Co-Expression von Bsk und der hierarchisch übergeordneten Kinase Hep letal. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen daher vermuten, daß Tao in *Drosophila* bei der Regulation des MAPK-Signaltransduktionswegs eine untergeordnete Funktion besitzt. Diese Annahme wird noch durch weitere Befunde unterstützt. Während der *Drosophila*-Embryogenese ist die JNK-Aktivität für den Prozeß des "Dorsal closure" von entscheidender Bedeutung.

“Dorsal closure” beschreibt die Bewegung der lateralen Epidermis zur dorsalen Mittellinie hin. Diese Bewegung ist notwendig, um die degenerierende Amnioserosa zu ersetzen und den Embryo vollständig mit epidermalem Gewebe zu umschließen. Liegen Mutationen in den Genen *bsk*, *hep* und *jun* vor, führt dies zu Embryonen ohne dorsale Epidermis (Stronach und Perrimon, 1999). Eine essentielle Funktion von Tao im JNK-Signaltransduktionsweg angenommen, sollten *tao*-mutante Embryonen ebenfalls einen solchen Phänotyp aufweisen. Dies ist nicht der Fall. Auch die Ausbildung der respiratorischen dorsal Appendices und der Micropyle während der Oogenese sind Prozesse, die unter anderem vom JNK-Signaltransduktionsweg reguliert werden. Folglich hat eine Reduktion der Aktivität des JNK-Signaltransduktionswegs mißgebildete dorsal Appendices und Micropylen zur Folge (Suzanne et al., 2001). Während der Oogenese *tao<sup>ts</sup>*-mutanter Weibchen konnten mißgebildete dorsale Appendices und Micropylen nicht beobachtet werden.

Eine Involvierung von Tao bei der Aktivierung der p38-Signaltransduktionskaskade, wie sie für die Kinasen Tao1 und Tao2 aus *Rattus norvegicus* beschrieben ist, konnte nicht ermittelt werden (s. Abschnitt 2.16). Der Nachweis einer Aktivierung von p38 wurde mittels eines phosphospezifischen Antikörpers erbracht, welcher nur zweifach phosphoryliertes und somit aktiviertes p38 bindet. Da diese Nachweismethode weniger sensitiv ist als der Nachweis einer genetischen Interaktion, wie sie im Fall des JNK-Signaltransduktionswegs erfolgt ist, kann eine sehr schwache Aktivierung von p38 durch Tao nicht ausgeschlossen werden.

### 3.8 Tao und Neurodegeneration

Die Familie der MARK/Par1-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von MAPT und anderer Mikrotubuli assoziierter Proteine (Drewes et al., 1995; Drewes et al., 1997; Illenberger et al., 1996; Nishimura et al., 2004). Da hyperphosphoryliertes MAPT und seine Aggregation zu PHF Merkmale von

Tauopathien sind, liegt die Vermutung nahe, daß eine Dysregulation der MARK/Par1-Aktivität die Ausbildung von Tauopathien begünstigen könnte (Timm et al., 2003). Wie gezeigt werden konnte, führt die neuronale Expression der mutanten MAPT-Variante R406W zu Neurodegeneration in adulten Fliegen (Wittmann et al., 2001). Somit ist es möglich, *Drosophila* als Modellsystem für Tauopathien zu nutzen und genetische Interaktionen *in vivo* zu untersuchen (Wittmann et al., 2001; Shulman and Feany, 2003). Wird R406W in Fotorezeptorneuronen exprimiert, ist eine Degeneration dieser Zellen zu beobachten, die in adulten Tieren einen RAP zur Folge hat. Aufgrund der Sensitivität des RAP gegenüber verstärkter oder abgeschwächter Neurodegeneration, spiegeln sich diese Effekte in der Ausprägung des RAP wieder. Eine Phosphorylierung von R406W durch Par1 und eine damit einhergehende Toxizität von R406W angenommen, sollte eine Co-Expression von R406W und Par1 eine starke Neurodegeneration zur Folge haben. Dies ist der Fall (Nishimura et al., 2004). Im Gegensatz zu der Expression von Par1, die abhängig vom Treiber und verwendeten Transgen zu Neurodegeneration führen kann, welche sich in einem RAP äußert (Nishimura et al., 2004), konnte ein RAP nach Expression von Tao nicht beobachtet werden. Die Par1-induzierten neurodegenerativen Effekte lassen sich durch eine Co-Expression von Tao verstärken. Auch in diesem Fall ist die Kinasedomäne von Tao für die Verstärkung des Par1-induzierten RAP obligat, da dieser nur durch Tao-long, nicht aber durch Tao-short verstärkt wird. Durch neuere Untersuchungen an *Drosophila* konnte *in vivo* gezeigt werden, daß *Drosophila*-Par1 humanes MAPT phosphoryliert. Diese Phosphorylierung durch Par1 ist anscheinend obligat für die weitere Phosphorylierung von MAPT durch andere Kinasen (Nishimura et al., 2004). Eine Regulation der Aktivität dieser Kinasen durch Tao kann nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der Daten von Timm und Mitarbeitern (Timm et al., 2003) kann jedoch angenommen werden, daß *Drosophila*-Tao analog zu Tao1 aus *Rattus norvegicus* an der Aktivierung der MARK/Par1-Kinasen beteiligt ist. Die Verstärkung des Par1-induzierten RAP durch Tao spricht ebenfalls für diese Hypothese.

Eine Aktivierung der JNK- und p38-Signaltransduktionswege, wie sie für die Vertreter der achten GCK-Unterfamilie der Vertebraten beschrieben ist, kann für *Drosophila*-Tao nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wird über eine Involvierung dieser beiden Signaltransduktionswege bei der Ausbildung der Alzheimerschen Krankheit spekuliert. Zum einen phosphorylieren JNK und p38 *in vitro* MAPT (Goedert et al., 1997; Jenkins et al., 2000), zum anderen konnte eine Co-Lokalisation von aktivem p38 und PHF in Gehirnschnitten von Alzheimerpatienten nachgewiesen werden (Hensley et al., 1999). Somit besteht die Möglichkeit, daß durch die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege MAPT phosphoryliert werden kann. In dem von mir verwendeten Modellsystem für Tauopathien ist eine Beteiligung von p38 an MAPT-induzierter Neurodegeneration unwahrscheinlich. Weder eine Überexpression von p38b noch die Reduzierung von p38b durch RNAi hatten einen Effekt auf den MAPT-induzierten RAP (nicht gezeigt). Auch eine Aktivierung des JNK-Signaltransduktionswegs scheint die Toxizität von MAPT nicht zu erhöhen, da die Co-Expression des JNK-Aktivators Hep und MAPT nicht zu einer Verstärkung des MAPT-induzierten RAP führt (nicht gezeigt). Daher ist eine Involvierung der p38- und JNK-Signaltransduktionswege bei der Ausprägung des MAPT-induzierten RAP nicht wahrscheinlich. Da der MAPT-induzierte RAP mit der Degeneration von Fotorezeptorneuronen in direktem Zusammenhang steht, ist folglich eine Verstärkung der MAPT-abhängigen Neurodegeneration durch p38- und/oder JNK-Aktivität nicht erkennbar.

Zusammenfassend konnte durch die "Gain of function"-Analysen gezeigt werden, daß *Drosophila*-Tao die MAPT-induzierten neurodegenerativen Effekte verstärken kann. Für diese Verstärkung ist die Kinasedomäne von Tao-long obligat. Ob Tao in diesem Zusammenhang als direkter Aktivator von Par1 fungiert, konnte nicht eindeutig ermittelt werden, ist jedoch wahrscheinlich. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der regulatorischen Bereiche der MAPKK und der MARK/Par1-Kinasefamilie kann eine Aktivierung beider Kinasefamilien durch Tao angenommen werden. Allerdings deuten die

vorgestellten *in vivo*-Daten eher auf eine Aktivierung der MARK/Par1-Kinasefamilie durch Tao hin.

## **4. Materialien und Methoden**

Die Durchführung molekularbiologischer Standardmethoden (Phenol/Chloroform-Extraktion, Präzipitation, enzymatische Manipulation von DNA, etc.) erfolgte nach Sambrook (Sambrook et al., 1989). Für enzymatische Reaktionen wie Restriktionsverdau, Dephosphorylierungen, Klenow-Polymerase-Reaktionen und Ligationen etc. wurden kommerzielle Enzyme (Roche, Fermentas, Biozym, Amersham-Pharmacia, New England Biolabs, Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Rezepte der im weiteren Verlauf genannten Lösungen und Puffer sind unter 4.6 aufgelistet.

### **4.1 Molekularbiologische Methoden**

#### 4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Je nach Menge der zu präparierenden Plasmid-DNA wurden “Mini”- oder “Maxi”-Kits (Qiagen und Macherey-Nagel) verwendet und die Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente, die durch “Polymerase Chain Reaction” (PCR) (Sambrook et al., 1989) oder Restriktionsverdau generiert wurden, wurden elektrophoretisch im Agarosegel getrennt (Sambrook et al., 1989). Die Aufreinigung der DNA aus den Gelen erfolgte unter Verwendung des “QiaQuick gel extraction”-Kits (Qiagen). Die Aufreinigung von Fragmenten, die nochmals enzymatisch behandelt wurden, erfolgte unter Verwendung des “QiaQuick PCR purification”-Kits (Qiagen).

#### 4.1.3 Präparation genomischer DNA aus Fliegen zur PCR-Analyse

Eine Fliege wurde in 50  $\mu$ l SB-Puffer homogenisiert und das Homogenisat 20-30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der im SB-Puffer enthaltenen Proteinase K bei 95°C für 2 min. Die so erhaltene DNA

ist bei 4-8°C mehrere Monate haltbar. Aus diesem Ansatz wurde 1 µl als "Template" pro PCR eingesetzt (Gloor et al., 1993).

### 4.1.4 Präparation genomischer DNA aus Fliegen und Southern-Blot-Analyse

10-30 Fliegen wurden in einem Eppendorf Gefäß (1,5 ml) mit einem Eppendorf-Pistill in 500 µl Lyse-Puffer homogenisiert. Dem Ansatz wurde 50 µg Proteinase K zugeben und 60 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µg RNAaseA folgte eine Inkubation bei 50°C für 20 min. Die Proteine wurden aus der wässrigen DNA-Lösung durch Phenolextraktion entfernt, und die DNA durch Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation gefällt. Anschließend wurde die DNA in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst. 3-5 µg der so erhaltenen genomischen DNA wurde im Restriktionsverdau fragmentiert. Die Inkubation der DNA mit den Restriktionsendonukleasen (10-20 U) erfolgte über Nacht bei 37°C. Die DNA-Fragmente wurden präzipitiert und das Pellet in 15 µl EB-Puffer gelöst. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte im Agarosegel. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf eine Nylon-Membran (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>; Amersham) wie folgt übertragen:

- \* Waschen des Gels in Denaturierungslösung für 5 min
- \* Transfer der DNA durch Kapillar-Übertrag unter Verwendung der Denaturierungslösung auf die Membran über Nacht
- \* 10 min Waschen der Membran in Neutralisierungslösung
- \* 5 min Waschen der Membran in 2x SSC
- \* Kovalentes Binden der DNA an die Membran durch UV-Strahlung (1,2 J/cm<sup>2</sup>)

Die Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden (s. Abschnitt 4.1.5) an die membrangebundene DNA erfolgt in "Rapid-hyb buffer" (Amersham) bei 65°C für 2 h. Anschließend wurde die Membran 10 min in 2x SSC + 0,1% SDS und 30-60 min in 0,2x SSC + 0,1% SDS bei 65°C gewaschen.

### 4.1.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die im Southern-Blot eingesetzten radioaktiv markierten Sonden wurden unter Verwendung des "Quick Prime Kits" (Amersham) nach Herstellerangaben

unter Einsatz von  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dCTP synthetisiert. Es wurde den Herstellerangaben entsprechend verfahren.

### 4.1.6 Herstellung Digoxigenin markierter RNA-Gegenstrang-Sonden

Zur Herstellung von Gegenstrang-Sonden für RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde das "RNA-Labeling and Detection Kit" (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Die markierte RNA wurde anschließend präzipitiert und in 150  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung resuspendiert. Fluorescein-markierte RNA-Gegenstrang-Sonden wurden analog hergestellt.

### 4.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines "ABI Prism 377/96"-Sequenzierautomaten (Applied Biosystems) unter Verwendung des "DNA Sequencing Kits" (Applied Biosystems). Zur Analyse der Sequenzen wurde die Software "Sequencher" (Gene Codes Corporation) verwendet.

Alle verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen wurden in gereinigtem Zustand von MWG oder NAPS bezogen.

### 4.1.8 RNA-Präparation

Die im folgenden beschriebene Methode wurde zur RNA-Gewinnung aus Embryonen, Larven, Puppen und adulten Fliegen angewendet. Zu präparierendes Material wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Mörsern homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein geeignetes Gefäß überführt und bei 4°C für 3 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Eine erste Reinigung der RNA erfolgte unter Verwendung des "Tri Reagent" (WAK-Chemie Medical) nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte eine zweite Reinigung der RNA mit Hilfe des "RNeasy Mini Kit" (Qiagen). Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte fotometrisch.

### 4.1.9 Northern-Blot

Je 15  $\mu\text{g}$  der zu analysierenden RNA-Proben (s. Abschnitt 4.1.9) wurden in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und



anschließend auf eine Nylon-Membran (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>; Amersham) transferiert. Zur Detektion der *tao*-mRNA wurde eine transkriptspezifische radiokativ markierte Sonde hybridisiert. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden dem "NorthernMax<sup>TM</sup>"-Kit (Ambion) entnommen. Die Synthese der Sonde erfolgte unter Verwendung von <sup>32</sup>P- $\alpha$ -dCTP und des "Strip-EZ<sup>TM</sup> RNA"-Kits (Ambion) nach Angaben des Herstellers.

Als Matrize für die RNA-Sonde diente ein BamHI/XhoI-Fragment (2813 bp) des cDNA-Klons LD40388 (GenBank No. AI520278). Dieses Fragment hybridisiert sowohl mit *tao*<sup>long</sup> als auch mit *tao*<sup>short</sup>.

### 4.1.10 RT-PCR

Die Aufbereitung der RNA sowie die reverse Transkription und die folgende PCR-Reaktion erfolgte unter Verwendung des "Titan One Tube RT-PCR Kits" (Roche) nach Herstellerangaben.

## **4.2 Histologische Methoden**

### 4.2.1 Präparation von *Drosophila*-Embryonen für Antikörperfärbungen und RNA-*in situ*-Hybridisierungen

Auf einer Apfelsaftagarplatte abgelegte Embryonen wurden durch Inkubation 5 min in Klorix:H<sub>2</sub>O (1:1) dechorioniert und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Fixierung der Embryonen erfolgte in Fixierungslösung:Heptan=1:1. Dieser Ansatz wurde 20 min kräftig geschüttelt. Nach der Fixierung wurde die untere wässrige Phase abgezogen und dem restlichen Ansatz 1 Volumen Methanol zugegeben. Inkubiert wurde der Ansatz im Schütteler für 5 min. Nach dem Absinken der Embryonen wurde das Heptan verworfen und die devitellinisierten Embryonen mehrmals in Methanol gewaschen. Die erhaltenen Embryonen wurden in Methanol bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 4.2.2 Präparation von Imaginalscheiben, Gehirnen und Ovarien

Imaginalscheiben und Gehirne wurden aus Larven des dritten Stadiums, Ovarien aus 3-5 Tage alten Weibchen präpariert. Die Präparation erfolgte in "Grace's Cell Culture Medium" (GIBCO). Anschließend wurden die Präparate in Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt, zweimal in PBT gewaschen und wie folgt fixiert.

Für *in situ*-Hybridisierungen erfolgte die Fixierung in PBT:RNA-Fix im Verhältnis 1:1. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde wie im Abschnitt 4.2.6 beschrieben verfahren. Für Antikörperfärbungen erfolgte die Fixierung in PEMT. Inkubation des Ansatzes für 5-15 min bei RT auf dem Drehrad. Anschließend wurden die Präparate kurz in PBT gewaschen. Im Fall von Ovarpräparationen wurden die Ovarien für 2-12 h in PBS + 1% TritonX100 gewaschen. Die weitere Behandlung der Präparate für Antikörperfärbungen ist in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

### 4.2.3 Antikörperfärbungen

Die Präparation der zu färbenden Objekte erfolgte wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Die Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind den Tabellen 4.1 und 4.2 zu entnehmen. Das fixierte Material wurde anschließend wie folgt behandelt:

- \* Waschen in 2x 20 min in BBT und 1x 20 min in BBT + 2% Schafserum
- \* Inkubation mit dem primären Antikörper in BBT + 2% Schafserum über Nacht bei 4°C
- \* Waschen 5x 10 min in PBT
- \* Inkubation mit dem sekundären Antikörper 1-2 h bei RT
- \* Waschen 4x 10 min in PBT

Die anschließende Weiterbehandlung der Proben richtet sich nach den verwendeten sekundären Antikörpern. Es wurde wie folgt verfahren:

1. Biotinylierte Sekundärantikörper (Vectastain<sup>TM</sup>-ABC-Kit, Vector Laboratories) wurden 30 min in Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase Gemisch

(AB-Komplex: Avidin und biotinylierte Meerrettichperoxidase, jeweils 2% (v/v) in PBT) inkubiert. Anschließend wurde 4 x 10 min in PBT gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte in 500  $\mu$ l PBT dem  $H_2O_2$  (final 0,01%) und Diaminobenzidin (final 0,2 mg/ml) zugesetzt wurde.

2. Mit alkalischer Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper wurden wie folgt verwendet: Die Präparate wurden 2x 5 min mit AP-Puffer gewaschen. Die Färbereaktion erfolgte in 1 ml AP-Puffer, dem 10  $\mu$ l NBT/BCIP (Roche) zugesetzt wurde.

Die Färbereaktionen unter Verwendung von biotinylierten oder mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpern wurde bei ausreichender Intensität der Farbsignale durch Zugabe von 500  $\mu$ l PBT beendet. Anschließend wurden die Objekte mehrfach gewaschen und in ein geeignetes Einbettungsmedium überführt.

3. Wurden Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper verwendet, so wurden die gefärbten Objekte nach dem Waschen direkt in ein geeignetes Einbettungsmedium überführt. Falls nötig wurde, eine Verstärkung des Fluoreszenz-Signals unter Verwendung des "TSA<sup>TM</sup> Cyanine 3" Kits (Perkin Elmer) erreicht.

Sollten in einem Ansatz zwei Antigene nachgewiesen werden, wurden dementsprechend sowohl zwei primäre als auch zwei sekundäre Antikörper parallel wie beschrieben eingesetzt. Die primären Antikörper mußten notwendigerweise unterschiedlichen Organismen entstammen, um deren spezifische Detektion mit den sekundären Antikörpern zu gewährleisten. Die enzymatischen Färbereaktionen wurden nacheinander durchgeführt, wobei zuerst mit Hilfe der Meerrettichperoxidase gefärbt wurde. Zwischen beiden Farbreaktionen wurde 3x 10 min mit PBT gewaschen.

Antikörper	Verdünnung	Referenz/Donor	Wirtstier
Anti-Vasa	1:5000	A. Herzig	Maus, polyklonal
Anti-22C10 (Anti-Futsch)	1:50	Fujita et al., 1982	Maus, monoklonal
Anti-Trol	1 : 3500	Friedrich et al., 2000	Kaninchen, polyklonal
Anti-phospho-p38	1:250	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen, monoklonal
Anti-Celeaved Caspase-3	1:1500	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen, polyklonal
Anti-Mhc	1:2000	D. Kiehart	Kaninchen, polyklonal
Anti-Tao (m2b2)	1:1000	R. Pflanz	Maus, polyklonal
Anti-GFP	1:500	Molecular Probes	Kaninchen, polyklonal

Tabelle 4.1: Liste der verwendeten primären Antikörper und deren Verdünnung

Die Auswahl der verwendeten sekundären Antikörper richtet sich nach den primären Antikörpern. Je nach gewünschter Anwendung wurden dann Fluorochrom- oder Enzym-Gekoppelte Antikörper verwendet.

Antikörper	Verdünnung	Referenz
anti-DIG-AP	1:2000	Roche
anti-Maus-AP	1:500	Roche
anti-Kaninchen-AP	1:500	Roche
anti-Kaninchen-biot.	1:500	Vector-Laboratories
anti-Maus-biot.	1:500	Vector-Laboratories
Anti-Maus-Alexa 488	1:500	Molecular Probes
Anti-Maus-Alexa 546	1:500	Molecular Probes
Anti-Kaninchen-Alexa 488	1:500	Molecular Probes
Anti-Kaninchen-Alexa 546	1:500	Molecular Probes

Tabelle 4.2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper und deren Verdünnung

### 4.2.4 Färbungen ohne Verwendung von Antikörpern

1. Die Färbung von filamentösem Aktin wurde unter Verwendung von TRITC-markiertem Phalloidin (Molecular Probes, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt. Die Inkubation mit Phalloidin erfolgte für 1-2 h in PBT. Anschließend wurde 5x 20 min mit PBT gewaschen, und die Präparate in ein geeignetes Einbettungsmedium überführt. Bei der Fixierung der Präparate war darauf zu achten, daß kein Methanol im Fixierungsprozeß verwendet wurde.
2. DNA-Färbungen unter Verwendung von "Sytox Green" (Molecular Probes). Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper oder Phalloidin wurde einem der folgenden Waschschrte RNase A (0,1 mg/ml) zugesetzt. Im Anschluß an den RNA-Verdau wurden die Präparate mit "Sytox Green" (0,1  $\mu\text{M}$ ) für 20 min in PBT inkubiert. Die gefärbten Präparate wurden 2x für 20 min mit PBT gewaschen und in ein geeignetes Einbettungsmedium überführt.
3. DNA-Färbungen unter Verwendung von DAPI erfolgten durch Einbetten in "Vectashield Mounting Medium" (Vector Laboratories), welches DAPI enthält.

### 4.2.5 RNA-*in situ*-Hybridisierungen

Durch RNA-*in situ*-Hybridisierungen kann die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten im zu untersuchenden Präparat bestimmt werden. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgte die Inkubation bei RT, wobei die Eppendorfgefäße auf dem Drehrad rotierten.

- Waschen der Präparate (3x 10 min) in PBT
- Inkubation für 3-7 min mit Proteinase K (25  $\mu\text{g/ml}$ ) in PBT
- Waschen in PBT (5x 3 min)
- Fixierung in PBT:RNA-Fix=1:1 für 20 min
- Waschen in PBT (5x 3 min)
- Waschen in Hybridisierungslösung (3x 1 min)
- Prähybridisierung bei 55°C im Wasserbad für 1 h
- Inkubation der Präparate in 30  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung und der Digoxigenin-markierten Sonde über Nacht bei 55°C
- Waschen in Hybridisierungslösung (2x 15 min bei 55°C)
- Waschen in PBT (3x 20min)

Der Nachweis der hybridisierten RNA-Sonde erfolgte unter Verwendung eines anti-Digoxigenin-Antikörpers, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Für die Signal-Detektion wurden die Präparate für 1 h mit dem Antikörper inkubiert und die Färbereaktion, wie unter Abschnitt 4.2.3 beschrieben, durchgeführt.

### 4.2.6 Einbettungsmedien

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die gefärbten Präparate in ein geeignetes Medium eingebettet. Die von mir verwendeten Einbettungsmedien sind:

Glycerol (Merck), "Vectashield Mounting Medium" mit und ohne DAPI (Vector Laboratories), Advantage Permanent Mounting Media (Biosciences), Canada Balsam (Sigma) und Mowiol.

Mowiol diente zur Einbettung von Präparaten, die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern behandelt wurden. Es wurde wie folgt hergestellt:

12 g Glycerol wurden mit 4,8 g Mowiol (Hoechst) bei RT auf dem Magnetrührer für ca. 1 h vermischt. Anschließend wurden 12 ml H<sub>2</sub>O hinzugefügt und weitere 2 h bei RT verrührt. Nach Zugabe von 24 ml Tris/HCl-Puffer (200 mM, pH8,5) wurde auf 50°C erhitzt und weitergerührt. Ungelöste Bestandteile wurden abzentrifugiert (8000x g), der Überstand aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 4.2.7 Mikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Beobachtungen wurden mit einem "Zeiss Axiophot"-Mikroskop (Carl Zeiss) vorgenommen. Epifluoreszenz-Mikroskopie erfolgte am Axioskop2 (Carl Zeiss). Für die Konfokalmikroskopie wurde ein LEICA-DM-RXA2-Mikroskop (Leica) verwendet.

### 4.2.8 Präparation adulter Fliegen für elektronenmikroskopische Aufnahmen

Adulte Fliegen des gewünschten Genotyps wurden in GA-Puffer für 1 h fixiert. Nach der Fixierung wurden die Fliegen mit Ethanol entwässert (aufsteigende Ethanol-Konzentration von 10-100%, 10 min je Stufe). Die entwässerten

Fliegen wurden einer kritischen Punkttrocknung mit CO<sub>2</sub> unterzogen und anschließend mit Platin überzogen (Sullivan et al., 2000).

### 4.3 Biochemische Methoden

#### 4.3.1 Western Blot

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte im Acrylamid-Gel, wobei je nach Größe der zu trennenden Proteine unterschiedliche Acrylamid- Konzentrationen verwendet wurden. Der elektrophoretische Transfer der nach Größe separierten Proteine auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran (Millipore) erfolgte bei 100 V für 1 h unter Verwendung einer „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Biorad). Bei weiteren Wasch- und Inkubationsschritten wurde die Membran unter leichter Rotation auf dem Schüttler inkubiert. Das Blocken der Membran erfolgte für 1 h in PBT + 5% BSA. Anschließend wurde 3x 5 min mit PBT gewaschen. Die Inkubation der Membran mit den jeweiligen primären Antikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach Entfernen des primären Antiköpers wurde 3x 15 min mit PBT gewaschen. Die Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörpern erfolgte bei RT für 1 h. Anschließend wurde die Membran 3x 15 min mit PBT gewaschen. Als Substrat für Biolumineszenz-Reaktion wurde „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat“ (Pierce) verwendet. Der Blot wurde 5 min in Substrat inkubiert. Die Detektion der Biolumineszenz erfolgte durch Exposition des Blots auf Röntgenfilm (Kodak).

### 4.4 Fliegen-genetik

Gene und ihre Transkriptionsprodukte werden nach Konvention *kursiv* geschrieben. Handelt es sich um dominante Allele eines Gens, wird mit einem großen Anfangsbuchstaben begonnen, handelt es sich um rezessive Allele, mit einem kleinen. Proteine werden nicht kursiv geschrieben und es wird mit einem Großbuchstaben begonnen (Steward et al., 1995).

Der Begriff „Mutante“ bzw „mutant“ bezeichnet homozygote Individuen. Im Fall von X-chromosomalen Mutationen werden die Begriffe „Mutante“ bzw.

“mutant” auch für hemizygoten Männchen verwendet. Genprodukte, die während der Oogenese von den Nährzellen gebildet werden, sind teilweise im Embryo nachweisbar. Diese maternale Komponente von Genprodukten kann entfernt werden (s. Abschnitt 4.4.7). Die Embryonen, welche keine maternale Komponente bestimmter Genprodukte erhalten, werden als maternal mutant bezeichnet. Erhält ein Embryo paternal ebenfalls ein mutantes Allel, so wird darüber hinaus auch als zygotisch mutant bezeichnet.

Als Marker werden Mutationen bezeichnet, die einen leicht zu erkennenden Phänotyp des mutanten Individuums zur Folge haben. Zu diesen gehören dominante Marker wie *Bar* (*B*), *Notch* (*N*), *Stubble* (*Sb*), *Serrate* (*Ser*) oder rezessive Marker wie *white* (*w*), *ebony* (*e*) etc.

Für Kreuzungsschemata wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Parental-Generation = P-Generation

Filial-Generation = F-Generation

Eine ausführliche Beschreibung der Balancier-Chromosomen und Markermutationen findet sich in Lindsley und Zimm (1992). Im weiteren Verlauf werden in Kreuzungsschemata nur die relevanten Marker aufgeführt. Sind noch weitere Marker vorhanden, werden diese, der einfacheren Schreibweise halber, nicht berücksichtigt.

### 4.4.1 Fliegenlinien

Stock	Referenz	Donor
<i>actin5C-GAL4</i>	Reichhart, 1997	Bloomington
<i>EP(1)1160</i>	Rorth, 1996	Bloomington
<i>EP(1)1619</i>	Harvie et al., 1998	Szeged
<i>troI<sup>15</sup></i>	Judd et al., 1972	Umea
<i>troI<sup>13</sup>/FM7a/ Dp(1;2;Y)w[+]</i>	Judd et al., 1972	Bloomington
<i>V3-GAL4</i>	Häcker und Perrimon, 1997	D. Brentrup
<i>en-GAL4</i>	Tabata et al., 1992	D. Brentrup
<i>elav-GAL4</i>	Lin und Goodman, 1994	Bloomington
<i>EP(1)1455</i>	Rorth, 1996	Bloomington
<i>l(1)G0023</i>	Peter et al., 2002	U. Schäfer
<i>l(1)G0271</i>	Peter et al., 2002	U. Schäfer



<i>I(1)G0374</i>	Peter et al., 2002	U. Schäfer
<i>FRT-101</i>	Perrimon	Bloomington
<i>ovo<sup>D1</sup>,FRT-101;FLP/ C(1)DX</i>	Perrimon	Bloomington
<i>UAS-par-1(N1S)-GFP</i>	Doerflinger et al., 2003	D. St Johnston
<i>UAS-hep</i>	Boutros et al., 1998	D. Bohman
<i>UAS-mekk1</i>	Inoue et al., 2001	H. Inoue
<i>UAS-tauR406W</i>	Wittmann et al., 2001	M. Feany
<i>strong UAS-par1</i>	Nishimura et al., 2004	B. Lu
<i>weak UAS-par1</i>	Nishimura et al., 2004	B. Lu
<i>dominant negativ UAS- Par1</i>	Nishimura et al., 2004	B. Lu
<i>UAS-tao<sup>short</sup>#1.3</i>	unpubliziert	R. Pflanz
<i>UAS-tao<sup>short</sup>#19.1</i>	unpubliziert	R. Pflanz
<i>UAS-tao<sup>long</sup>#18.1</i>	unpubliziert	R. Pflanz
<i>UAS-tao<sup>long</sup>#8.1</i>	unpubliziert	R. Pflanz
<i>Jump starter</i>	Robertson et al., 1988	EMBL
<i>sev-Gal4 K24, K25</i>	Konrad Basler	Konrad Basler
<i>UAS-p38b</i>	Adachi-Yamada et al., 1999	K. Matsumoto

Tabelle 4.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenlinien

### 4.4.2 Komplementationsanalysen letaler *troI*-Allele

Hemizygote Männchen letaler X-chromosomaler Allele sind nicht lebensfähig. Um Komplementationsanalysen letaler Allele durchführen zu können, ist daher eine Duplikation notwendig. Im Fall der genomischen Region 3A des X-Chromosoms, in welcher der *troI*-Lokus kartiert wurde, ist eine solche Duplikation vorhanden. Bei der von mir verwendeten Duplikation Dp(1;2;Y) sind Teile des X-Chromosoms mit dem Y-Chromosom fusioniert. Männchen, die für ein letales *troI*-Allele hemizygot sind und die Duplikation auf dem Y-Chromosom tragen, sind vital und fertil. Diese Männchen wurden mit "Jungfrauen" gekreuzt, welche heterozygot für ein *troI*-Allel waren. In der Folgegeneration wurde nach Weibchen gesucht, welche die beiden *troI*-Allele in *trans* aufwiesen. Konnten diese nicht identifiziert werden, so ist davon auszugehen, daß es sich bei den getesteten Letalmutationen um *troI*-Allele handelt. Desweiteren kann in der Folgegeneration festgestellt werden, ob die Duplikation den letalen Phänotyp des zu testenden Allels rettet. Können in der F1-Generation Männchen ohne X-chromosomales Balanzierchromosom identifiziert werden, so kann durch die Duplikation die Letalität des zu testenden Allels geheilt werden.

### 4.4.3 Erzeugung von Revertanten

Um zu überprüfen, ob ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp einer P-Element-Insertionslinie tatsächlich auf den Integrationsort des P-Elements zurückzuführen ist, werden "Revertierungsexperimente" durchgeführt (Bellen et al., 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Experimente ausschließlich mit *white*[+]-markierten P-Elementen (rote Augenfarbe) vorgenommen. Daher wurden alle Kreuzungsexperimente in einem *white*-mutanten Hintergrund (weiße Augenfarbe) durchgeführt.

Zur Erzeugung von Revertanten wird das jeweilige P-Element durch Einkreuzen einer "Transposase-Quelle" ( $\Delta 2-3$ ) mobilisiert. In der Parentalgeneration wird die P-Element-Insertionslinie mit der "Transposase-Quellen-Linie" gekreuzt. In der F1-Generation werden "Jungfrauen" isoliert, die sowohl das P-Element (rote Augen) als auch die Transposasequelle, am *Sb*-Marker erkennbar, aufweisen. Diese werden nun wieder mit "Balanzier-Männchen" (*FM6*) verpaart. In der F2-Generation wurde nach Individuen gesucht, die eine weiße Augenfarbe aufwiesen ( $\Delta P$ ). Konnten Männchen mit weißen Augen ohne den Bar-Marker (*FM6*) erhalten werden, so war davon auszugehen, daß eine Remobilisierung des P-Elements stattgefunden hatte. Desweiteren ist mit der Exzision des P-Elements der letale Phänotyp nicht mehr vorhanden. Der letale Phänotyp wurde demnach durch die Insertion des P-Elements verursacht.

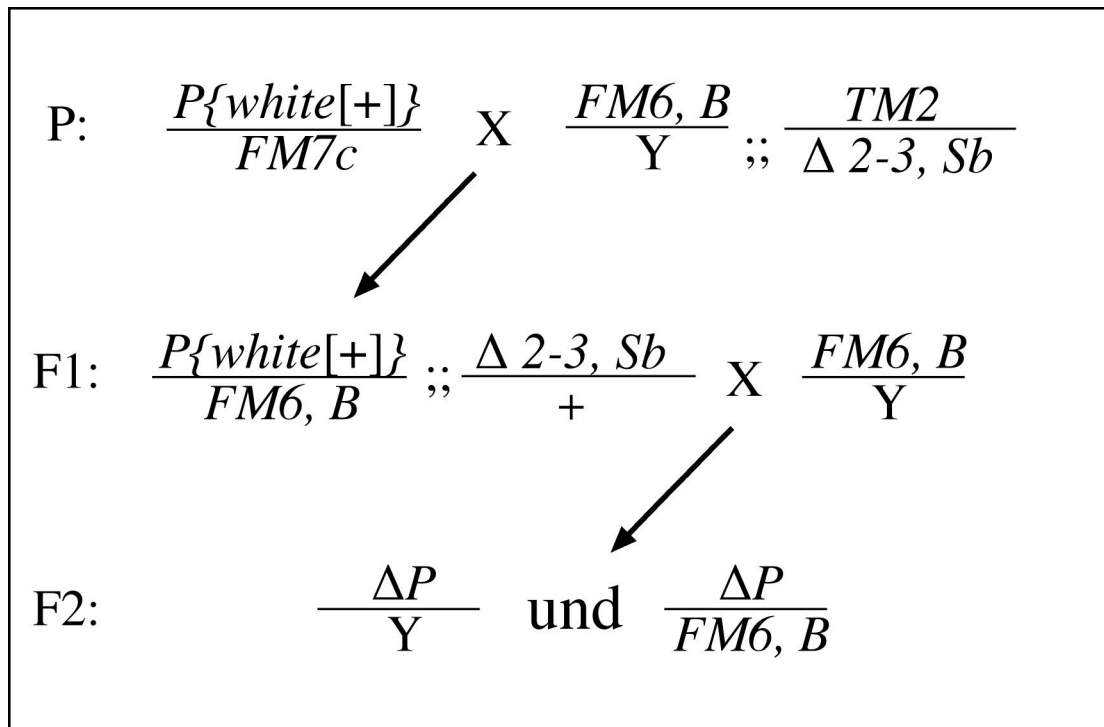


Abbildung 4.1: Kreuzungsschema für die Remobilisierung von P-Elementen

Aus Gründen der besseren Übersicht sind in diesem Schaubild nur die Marker der verwendeten Elemente aufgeführt. Von mir verwendete Vereinfachungen:

$P\{white[+]\}$  beschreibt  $P\{lacZ\}$

$\Delta 2-3, Sb$  beschreibt  $TM3, Sb[1] P\{ry[+t7.2]=\Delta 2-3\}99B$

#### 4.4.4 Erzeugung neuer Allele mittels ungenauer Exzision eines P-Elements

Die hierzu durchgeführten Kreuzungen wurden analog zu dem Kreuzungsschema zum Erhalt von Revertanten vorgenommen. Aus den in der F2-Generation erhaltenen  $\Delta P$ -Individuen wurden stabile Linien etabliert. Konnten in der folgenden Generation nur Männchen des Balanzierchromosoms ( $FM6$ ) erhalten werden, wurden diese Stämme als Kandidaten für eine ungenaue Exzision des transponierbaren Elements etabliert und später molekular analysiert.

#### 4.4.5 Remobilisierung zweier transponierbarer Elemente zur Erzeugung einer Defizienz

Durch die simultane Remobilisierung von zwei transponierbaren Elementen in *trans* kann eine Deletion definierter Größe erzeugt werden. Der *trol*-Lokus wurde unter Verwendung der Insertionslinien *EP(1)1619* und *I(1)GO271*

deletiert (s. Abb. 2.2). Die Insertionslinie *EP(1)1619* ist homozygot vital und fertil, homozygote Individuen der Insertionslinie *l(1)GO271* sind letal. Bei der parallelen Remobilisierung von zwei transponierbaren Elementen finden auch Rekombinationsereignisse statt. Um diese Ereignisse verfolgen zu können, wurden Marker-Mutationen mit den transponierbaren Elementen rekombiniert. Der dominante Marker *Bar* (*B*) wurde mit *EP(1)1619* rekombiniert, der rezessive Marker *yellow* (*y*) mit *l(1)GO271*.

Bei der beschriebenen Methode entsteht eine Deletion definierter Größe. Daher erfolgte die Analyse der Linien mit Hilfe der PCR, wobei Primer verwendet wurden, welche zu Sequenzen komplementär sind, die den Insertionsorten der transponierbaren Elemente *l(1)GO271* und *EP(1)1619* benachbart sind (s. Abb. 4.2 B).

Primersequenzen:

5'-ACGAACCAAATGTGTGAAAATTGGC-3'

5'-GCATACTTTTGGGCGCGCTTCG-3'

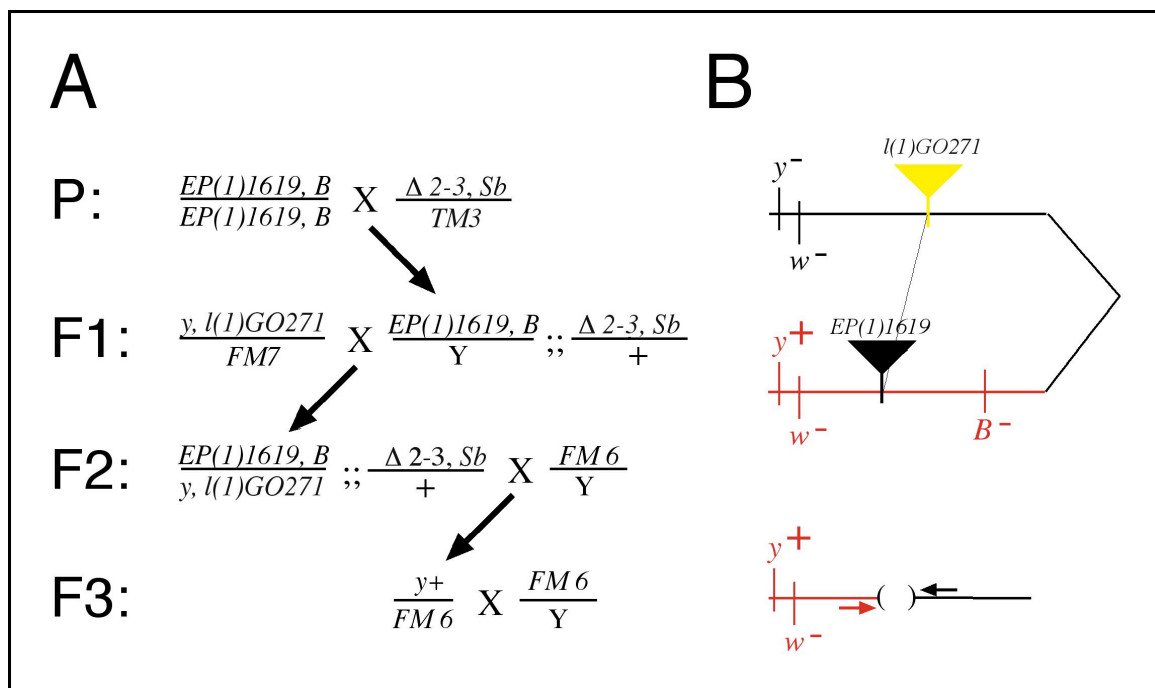


Abbildung 4.2: Erzeugung der *tro<sup>null</sup>*-Deletion

(A) Kreuzungsschema. In der P-Generation wurden homozygote Weibchen der Insertionslinie *EP(1)1619, B* mit Männchen der "Transposase-Quellen-Linie" ( $\Delta 2-3, Sb$ ) verpaart. Aus dieser Kreuzung gehen in der F1-Generation Männchen hervor, die hemizygot für das P-Element und heterozygot für die Transposase-Quelle sind. Die Segregation der

Chromosomen konnte anhand der Marker *Sb* und *B* leicht verfolgt werden, so daß eine eindeutige Identifikation dieser Männchen möglich war. Diese Männchen wurden mit "Jungfrauen" verpaart, die heterozygot für das transponierbare Element *y, l(1)GO271* waren. In der F2-Generation wurden "Jungfrauen" isoliert, die transheterozygot für die transponierbaren Elemente und heterozygot für die Transposasequelle waren. Diese "Jungfrauen" wurden mit Männchen des Balancierchromosoms *FM6* verpaart. In der F3-Generation wurde nach "Jungfrauen" gesucht, die eine weiße Augen aufwiesen. Aufgrund der weißen Augen konnte bei diesen Individuen von (einem) Remobilisationsereignis(sen) ausgegangen werden (s. Abschnitt 4.4.3). (B) Schematische Darstellung des Remobilisations- und Rekombinationsereignisses und der resultierenden Verteilung der Marker. Anhand der Lokalisation der Marker auf den jeweiligen Chromosomen konnten Rekombinationsereignisse während der Remobilisation nachvollzogen werden. Das Balancierchromosom *FM6* weist die Marker *y* und *B* auf. Somit können *y*-homozygote Individuen (gelbe Körperfarbe) identifiziert werden. Eine Unterscheidung zwischen *B*-homozygoten und *B*-heterozygoten Individuen ist ebenfalls möglich. Rekombinationsereignisse, wie sie in 4.2 B durch die unterschiedliche Farbgebung verdeutlicht sind, können folglich anhand der Kombination der Marker-Mutationen *y* und *B* nachgewiesen werden. In der F3-Generation wurde nach weißäugigen "Jungfrauen" gesucht, die sowohl *B*- als auch *y*-heterozygot waren. Diese "Jungfrauen" wurden erneut mit Männchen des Balancierchromosoms *FM6* verpaart, um eine stabile Linie zu etablieren. Wurde in der F4-Generation eine X-chromosomale vermittelte Letalität festgestellt (nur *FM6*-Männchen), erfolgte eine molekulare Analyse der Linie. Die Bindungsstellen der Primer, welche für die molekulare Analyse der letalen Linien verwendet wurden, sind durch Pfeile dargestellt.

Von 120 Weibchen des gewünschten Phänotyps wurden stabile Linien etabliert und diese auf Letalität untersucht. In 16 Fällen konnte X-chromosomal vermittelte Letalität identifiziert werden. Bei der PCR-Analyse zweier Linien konnte mit den angegebenen Primern ein PCR-Produkt kleiner als 1 kb erhalten werden.

Anzahl der F3 Einzelkreuzungen	Anzahl der etablierten letalen Linien	Anzahl der erhaltenen <i>tro<sup>pull</sup></i> -Deletionen
120	16	2

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Kreuzungsexperimente

Somit war davon auszugehen, daß eine Deletion genomischer Bereiche stattgefunden hatte. Eine dieser Linien wurde daher eingehend analysiert.

Dabei konnte eine Deletion von 47908 bp nachgewiesen werden, welche den *tro*-Lokus deletiert. Diese Deletionen wurden mit Hilfe der "Southern-Blot-Analyse" nochmals verifiziert (nicht gezeigt) und als *tro<sup>null</sup>* bezeichnet.

### 4.4.6 Identifikation hemizygoter Individuen

Zur Identifikation von hemizygoten Individuen können speziell markierte Balancier-Chromosomen genutzt werden. Diese zeichnen sich durch leicht zu identifizierende Marker aus. Im Fall von X-chromosomalen Genen sind Männchen hemizygot. Ausgehend von "balanzierten" stabilen Linien lassen sich somit leicht homo- bzw. hemizygote Individuen erkennen.

Zur Identifikation hemizygoter Larven wurde das Balancier-Chromosom *FM7i,P{act-GFP}* genutzt. Dieses Chromosom weist ein Transgen auf, welches unter der Kontrolle des Actin-Promotors die Expression von GFP vermittelt. Hemizygote Larven wurden mit Hilfe des Epifluoreszenz-Stereomikroskops identifiziert, wobei Larven ohne GFP-Signal als hemizygot angesehen wurden.

Die Identifikation hemizygoter Individuen mittels Antikörperfärbungen oder *in situ*-Hybridisierungsexperimenten erfolgte unter Verwendung des Balancierchromosoms *FM7,P{ftz-lacZ}*. Eine P-Element-Insertion auf diesem Chromosom vermittelt die Expression des *lacZ*-Gens unter der Kontrolle des *ftz*-Promotors.

Die Expression des *lacZ*-Gens kann mit Hilfe entsprechender RNA-Sonden nachgewiesen werden. Das Protein  $\beta$ -Galactosidase, welches vom *lacZ*-Gen codiert wird, kann hingegen mit Antikörpern nachgewiesen werden. Als hemizygot wurden Individuen angesehen, bei denen keine *lacZ*-Expression bzw. keine  $\beta$ -Galactosidase nachweisbar waren.

### 4.4.7 Keimbahnklone

Keimbahnklone wurden mit Hilfe der FLP-Rekombinase und FRT-abhängiger Rekombination hergestellt (Chou and Perrimon, 1992). Die FLP-Rekombinase aus Hefe vermittelt die Rekombination zwischen Chromosomen, welche bestimmte Sequenzen, sogenannte FRT-Sequenzen aus Hefe, aufweisen.

Daher wurde das Allel *tro<sup>null</sup>* mit dem “FRT-101“ rekombiniert. Weiterhin wurde die dominant sterile Mutation *ovo<sup>D1</sup>* genutzt.

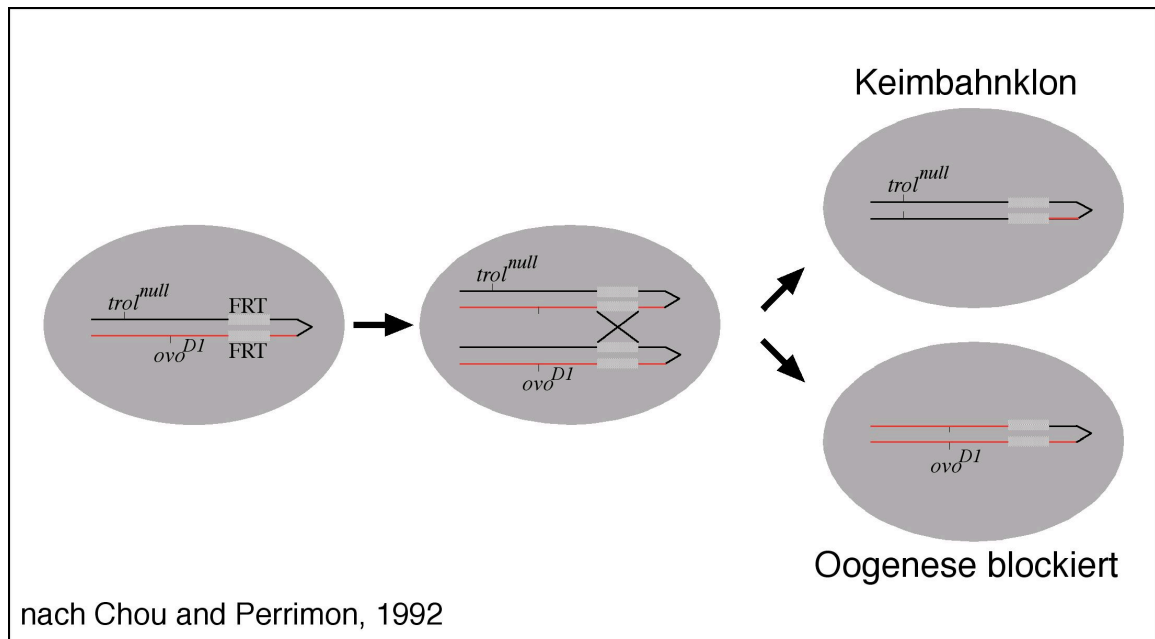


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Herstellung von Keimbahnklonen. Zellen sind durch graue Ovale, die unterschiedlichen Chromosomen durch schwarze bzw. rote Linien dargestellt. Relevante Allele sind markiert.

Heterozygote Weibchen des Allels *ovo<sup>D1</sup>* entwickeln atrophische Ovarien, deren Follikel vor der Vitellogenese degenerieren. Findet in den Keimzellen dieser Weibchen eine mitotische Rekombination statt, trennen sich die Allele *ovo<sup>D1</sup>* und *tro<sup>null</sup>* (s. Abb. 4.3). Somit entstehen rekombinante Tochterzellen, welche zur Eiproduktion fähig und homozygot für das Allel *tro<sup>null</sup>* sind. Die FLP-Rekombinase, die das Rekombinationsereignis vermittelt, steht unter der Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors. Die Expression der FLP-Rekombinase wurde daher durch Hitzeschock während der larvalen Stadien induziert. Als effektiv hat sich ein Hitzeschock von 1 h bei 38°C erwiesen. Dieser wurde 48 und 72 h nach Eiablage durchgeführt.

#### 4.4.8 Evaluation der “Gain of function“ Phänotypen

Konnte in “Gain of function“-Experimenten ein vom Wildtyp abweichender Phänotyp ermittelt werden, wurde dies durch mindestens ein weiteres unabhängiges Experiment verifiziert. Darüber hinaus wurde der Phänotyp

durch zwei Personen überprüft, die keinen Zugang zu den verkreuzten Genotypen hatten. Verglichen wurden mindestens 10 Fliegen je Genotyp.

### **4.5 *In silico*-Analysen und Software**

#### 4.5.1 Sequenzvergleiche

Zur Identifikation orthologer Nukleotid- oder Peptid-Sequenzen wurden die Server des “National Institute of Health” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) unter Verwendung des Blast-Algorithmus (Altschul et al., 1997) genutzt.

#### 4.5.2 Sequenzabgleiche

Zum Abgleich von Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen wurde der ClustalW-Service des “European Bioinformatics Institute” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) verwendet (Thompson et al., 1994). Die erhaltenen Sequenzabgleiche wurden zur besseren Übersicht mit Hilfe des Programms „MacBoxshade2.15“ (Apple) farbig hinterlegt.

#### 4.5.3 Identifikation von Domänen

Die Identifikation von Domänen innerhalb einer Proteinsequenz wurden unter Verwendung des ExPASy-Servers (Gasteiger et al., 2003) mit Hilfe der PROSITE-Datenbank (Hulo et al., 2004) durchgeführt.

#### 4.5.4 Erstellung eines “Neighbour Joining Trees“

Zur Erstellung des “Neighbour Joining Trees“ (s. Abb. 2.9 B) wurden die Peptidsequenzen von Tao1, Tao2, JIK und PSK unabhängig voneinander mit *Drosophila*-Proteindatenbanken verglichen. Proteine mit hinreichender Sequenzhomologie wurden ausgewählt und anschließend wiederum mit humanen Proteindatenbanken verglichen. Mit den so ermittelten homologen Proteinsequenzen wurde ein multipler Sequenzabgleich durchgeführt. Anschließend wurden die konservierten Kinasedomänen der einzelnen Proteine zur Erstellung eines “Neighbour Joining Trees“ verwendet. Hierzu



wurde ebenfalls der ClustalW-Service des "European Bioinformatics Institute" (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) verwendet (Thompson et al., 1994).

Die Bearbeitung der digitalen Abbildungen erfolgte unter Verwendung der Programme „Photoshop“ (AdobeSystems) und „FreeHand“ (Macromedia).

### 4.6 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
AP-Puffer	100 mM Tris pH9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM Levamisolchlorid
BBT	10 mM Tris, 55 mM NaCl, 40 mM KCL, 7 mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM Glukose, 50 mM Sacharose, 0,1% BSA, 0,1% Tween-20; pH 6,95
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
EB-Puffer	10 mM Tris/HCL, pH 8,5
Fixierungslösung	100 mM Hepes, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 1 mM EGTA, 3,7% Formaldehyd; pH 6,9
GA-Puffer	0,002 % OsO <sub>4</sub> , 2,5 % Glutaraldehyd in PBT; pH 6
Hybridisierungslösung ( <i>in situ</i> )	50% Formamid, 5x SSC, 50 µg/ml Heparin, 5 mg/ml Torula Yeast RNA (Sigma), 0,1% Tween-20; pH 6,7
Lyse-Puffer	20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 2% SDS; pH7,5
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl; pH7,5
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
PBT	PBS + 0,1% Tween 20
PEMT	16,7mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 75mM KCl; 25mM NaCl, 3,3 mM MgCl <sub>2</sub> , 5% (w/v) Paraformaldehyd; pH6,8
RNA-Fix	10% Paraformaldehyd in PBS, 50 mM EGTA
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
SB-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,2; 1 mM EDTA, 25 mM NaCl; 200 µg/ml Proteinase K
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl; pH 7,4

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
bp	Basenpaare
biot.	biotinyliert
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(b-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tag
FTDP-17	Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to Chromosome 17
GCK	Germinal Center Kinases
h	Stunde
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
MAPT	Mikrotubuli assoziiertes Protein Tau
min	Minuten
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	neurofibrillary tangles
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
PAK	p21 Activated Kinases
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHF	paired helical filaments

## Abkürzungen

---

RAP	Rauhe-Augen-Phänotyp
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylphosphat
sec	Sekunde
SEM	Scanning Electron Micrographs
Tab.	Tabelle
UTR	untranslatierte Region einer RNA
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen

## 5. Zusammenfassung

Die Vermittlung von interzellulärer Kommunikation wird von Matrix-, Membran- und intrazellulären Rezeptormolekülen gewährleistet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das *troI*-Gen von *Drosophila* unter Verwendung von genetischen und molekularbiologischen Techniken untersucht. Mit der Identifikation letaler *troI*-Allele, welche durch P-Elementmutagenese generiert wurden, war es möglich, die bis dahin unbekannte Transkriptionseinheit des *troI*-Gens zu indentifizieren. Bei dem von *troI* codierten Protein handelt es sich um *Drosophila*-Perlecan, einer Matrixkomponente, welche für die Konzentration und/oder Rezeption von extrazellulären Liganden verantwortlich ist.

Hypomorphe *troI*-Allele weisen einen charakteristischen und namensgebenden Phänotyp auf: die Reduzierung der optischen Loben larvaler Gehirne. Eine Null-Mutation des ca. 60 kb umfassenden *troI*-Lokus wurde erzeugt und anschließend phänotypisch untersucht. *troI*<sup>null</sup>-mutante Individuen weisen einen *troI*-charakteristischen Phänotyp auf und sterben in den larvalen Stadien. *troI* ist also ein essentielles Gen. Seine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen wird diskutiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit steht die Funktionsanalyse der Ste20-ähnlichen Kinase Tao im Vordergrund, die mit "Gain of Function" und "Loss of Function"-Experimenten durchgeführt wurde. *Drosophila-tao* codiert für zwei Transkripte, die sich durch die Präsenz oder das Fehlen einer Kinasedomäne unterscheiden. Die phänotypische Charakterisierung verschiedener *tao*-Allele zeigt, daß es sich bei *tao* auch um ein essentielles Gen handelt, dessen Dysfunktion die Oogenese und die Metamorphose betrifft. "Gain of Function"-Experimente wurden durchgeführt, um die Übertragbarkeit der bekannten Funktionen der Tao-homologen Kinasen aus Vertebraten auf die *Drosophila*-Kinase zu überprüfen. Wie bei Vertebraten wirkt die Tao-Kinase von *Drosophila* als ein Aktivator des JNK-Signaltransduktionswegs. Darüber hinaus können Prozesse, die durch Tau-Dysfunktion induziert sind, durch

Tao-Expression verstärkt werden. Diese Verstärkung beruht wahrscheinlich auf einer Aktivierung der Par1-Kinase durch Tao-Aktivität.

Die Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Tao sowohl bei der Etablierung als auch bei der Aufrechterhaltung von neuronalen Strukturen hin.

## 6. Referenzen

Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. and Matsumoto, K. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 19, 2322-9.

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.

Ahlgren, S.C. and Bronner-Fraser, M. (1999) Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol* 9, 1304-14.

Akam, M. (1987) The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101, 1-22.

Alton, A.K., Fachtel, K., Terry, A.L., Meikle, S.B. and Muskavitch, M.A. (1988) Cytogenetic definition and morphogenetic analysis of Delta, a gene affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 235-45.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402.

Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G. and Yaron, A. (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79, 1005-13.

Baeg, G.H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S. and Perrimon, N. (2001) Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 128, 87-94.

Bate, C.M. (1976) Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morphol* 35, 107-23.

## Referenzen

---

Binari, R.C., Staveley, B.E., Johnson, W.A., Godavarti, R., Sasisekharan, R. and Manoukian, A.S. (1997) Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development* 124, 2623-32.

Böhm, H., Brinkmann, V., Drab, M., Henske, A. and Kurzchalia, T.V. (1997) Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr Biol* 7, 603-6.

Bork, P., Holm, L. and Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242, 309-20.

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. and Mlodzik, M. (1998) Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-18.

Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.

Brickman, M.C. and Gerhart, J.C. (1994) Heparitinase inhibition of mesoderm induction and gastrulation in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 164, 484-501.

Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1997) Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals. *Essays Biochem* 32, 1-16.

Caldwell, M.C. and Datta, S. (1998) Expression of cyclin E or DP/E2F rescues the G1 arrest of *trol* mutant neuroblasts in the *Drosophila* larval central nervous system. *Mech Dev* 79, 121-30.

Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

Chen, Z., Hutchison, M. and Cobb, M.H. (1999) Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase binding domain. *J Biol Chem* 274, 28803-7.

Chen, Z., Raman, M., Chen, L., Lee, S.F., Gilman, A.G. and Cobb, M.H. (2003) TAO (thousand-and-one amino acid) protein kinases mediate signaling from carbachol to p38 mitogen-activated protein kinase and ternary complex factors. *J Biol Chem* 278, 22278-83.

Chou, T.B. and Perrimon, N. (1992) Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 131, 643-53.

Cohen, I.R., Grassel, S., Murdoch, A.D. and Iozzo, R.V. (1993) Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10404-8.

Cox, D.N., Lu, B., Sun, T.Q., Williams, L.T. and Jan, Y.N. (2001) *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr Biol* 11, 75-87.

Cronmiller, C., Schedl, P. and Cline, T.W. (1988) Molecular characterization of daughterless, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. *Genes Dev* 2, 1666-76.

## Referenzen

---

Dan, I., Watanabe, N.M. and Kusumi, A. (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11, 220-30.

Danielson, K.G., Martinez-Hernandez, A., Hassell, J.R. and Iozzo, R.V. (1992) Establishment of a cell line from the EHS tumor: biosynthesis of basement membrane constituents and characterization of a hybrid proteoglycan containing heparan and chondroitin sulfate chains. *Matrix* 12, 22-35.

Datta, S. (1995) Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development* 121, 1173-82.

Datta, S. and Kankel, D.R. (1992) *l(1)trol* and *l(1)devl*, loci affecting the development of the adult central nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 130, 523-37.

Davis, R.J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 19, 470-3.

Desbordes, S.C. and Sanson, B. (2003) The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* 130, 6245-55.

Doe, C.Q. and Technau, G.M. (1993) Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS. *Trends Neurosci* 16, 510-4.

Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J.M. and St Johnston, D. (2003) The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development* 130, 3965-75.

Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270, 7679-88.

Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297-308.

Drogen, F., O'Rourke, S.M., Stucke, V.M., Jaquenoud, M., Neiman, A.M. and Peter, M. (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol* 10, 630-9.

Ebens, A.J., Garren, H., Cheyette, B.N. and Zipursky, S.L. (1993) The *Drosophila* anachronism locus: a glycoprotein secreted by glia inhibits neuroblast proliferation. *Cell* 74, 15-27.

FlyBase Consortium (1999) The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Research* 27, 85-8.

Forbes, A.J., Spradling, A.C., Ingham, P.W. and Lin, H. (1996) The role of segment polarity genes during early oogenesis in *Drosophila*. *Development* 122, 3283-94.



## Referenzen

---

Friedrich, M.V., Schneider, M., Timpl, R. and Baumgartner, S. (2000) Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. Sequence, recombinant analysis and tissue expression. *Eur J Biochem* 267, 3149-59.

Fujita, S.C., Zipursky, S.L., Benzer, S., Ferrus, A. and Shotwell, S.L. (1982) Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7929-33.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-8.

Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1989) Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet* 5, 251-5.

Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C. (1990) Early events in the development of *Drosophila* peripheral nervous system. *J Physiol (Paris)* 84, 11-20.

Gilbert, S.F. (1997) *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. Fifth edition, 1997

Gloor, G.B., Preston, C.R., Johnson-Schlitz, D.M., Nassif, N.A., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertson, H.M. and Engels, W.R. (1993) Type I repressors of P element mobility. *Genetics* 135, 81-95.

Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A. and Cohen, P. (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 409, 57-62.

Green, P., Hartenstein, A.Y. and Hartenstein, V. (1993) The embryonic development of the *Drosophila* visual system. *Cell Tissue Res* 273, 583-98.

Guan, Z., Prado, A., Melzig, J., Heisenberg, M., Nash, H.A. and Raabe, T. (2000) Mushroom body defect, a gene involved in the control of neuroblast proliferation in *Drosophila*, encodes a coiled-coil protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8122-7.

Guo, S. and Kemphues, K.J. (1995) *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. pp. 611-20.

Häcker, U., Lin, X. and Perrimon, N. (1997) The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* 124, 3565-73.

Haerry, T.E., Heslip, T.R., Marsh, J.L. and O'Connor, M.B. (1997) Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 124, 3055-64.

Halaby, D.M. and Mornon, J.P. (1998) The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. *J Mol Evol* 46, 389-400.

Halaby, D.M., Poupon, A. and Mornon, J. (1999) The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng* 12, 563-71.

## Referenzen

---

Han, H.J., Tokino, T. and Nakamura, Y. (1998) CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 7, 1039-46.

Handler, M., Yurchenco, P.D. and Iozzo, R.V. (1997) Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 210, 130-45.

Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J.A. (1984) Early neurogenesis in wildtype *Drosophila melanogaster* Wilhem Roux's *Arch Dev Biol* 193, 308-325.

Hartenstein, V. and Campos-Ortega, J.A. (1985) Fate mapping in wildtype *Drosophila melanogaster*. I. The pattern of embryonic cell divisions. *Wilhem Roux's Arch Dev Biol* 194, 181-195

Harvie, P.D., Filippova, M. and Bryant, P.J. (1998) Genes expressed in the ring gland, the major endocrine organ of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149, 217-31.

Hassell, J.R., Robey, P.G., Barrach, H.J., Wilczek, J., Rennard, S.I. and Martin, G.R. (1980) Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4494-8.

Hensley, K., Floyd, R.A., Zheng, N.Y., Nael, R., Robinson, K.A., Nguyen, X., Pye, Q.N., Stewart, C.A., Geddes, J., Markesbery, W.R., Patel, E., Johnson, G.V. and Bing, G. (1999) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72, 2053-8.

Hulo, N., Sigrist, C.J., Le Saux, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Bordoli, L., Gattiker, A., De Castro, E., Bucher, P. and Bairoch, A. (2004) Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 32, D134-7.

Hutchison, M., Berman, K.S. and Cobb, M.H. (1998) Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 273, 28625-32.

Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. and Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-5.

Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernat, J., Meyer, H.E., Olmsted, J.B., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* 271, 10834-43.

Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T., Ninomiya-Tsuji, J., Irie, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K. (2001) A *Drosophila*

## Referenzen

---

MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK. *Embo J* 20, 5421-30.

Iozzo, R.V., Cohen, I.R., Grassel, S. and Murdoch, A.D. (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 302 ( Pt 3), 625-39.

Ito, K. and Hotta, Y. (1992) Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 149, 134-48.

Jenkins, S.M. and Johnson, G.V. (2000) Microtubule/MAP-affinity regulating kinase (MARK) is activated by phenylarsine oxide in situ and phosphorylates tau within its microtubule-binding domain. *J Neurochem* 74, 1463-8.

Jenkins, S.M., Zinnerman, M., Garner, C. and Johnson, G.V. (2000) Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J* 345 Pt 2, 263-70.

Johansen, K.M., Fehon, R.G. and Artavanis-Tsakonas, S. (1989) The notch gene product is a glycoprotein expressed on the cell surface of both epidermal and neuronal precursor cells during *Drosophila* development. *J Cell Biol* 109, 2427-40.

Judd, B.H., Shen, M.W. and Kaufman, T.C. (1972) The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 71, 139-56.

Kallunki, P. and Tryggvason, K. (1992) Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 116, 559-71.

Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G. and Cheng, N.S. (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-20.

Khare, N. and Baumgartner, S. (2000) Dally-like protein, a new *Drosophila* glypican with expression overlapping with wingless. *Mech Dev* 99, 199-202.

Kidd, S., Baylies, M.K., Gasic, G.P. and Young, M.W. (1989) Structure and distribution of the Notch protein in developing *Drosophila*. *Genes Dev* 3, 1113-29.

Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60, 443-75.

Klämbt, C., Jacobs, J.R. and Goodman, C.S. (1991) The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* 64, 801-15.

Kramer, K.L. and Yost, H.J. (2003) Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. *Annu Rev Genet* 37, 461-84.

Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-69.

## Referenzen

---

Lee, L.A. and Orr-Weaver, T.L. (2003) Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu Rev Genet* 37, 545-78.

Levin, D.E. and Bishop, J.M. (1990) A putative protein kinase gene (*kin1+*) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8272-6.

Liang, Z. and Biggin, M.D. (1998) *Eve* and *ftz* regulate a wide array of genes in blastoderm embryos: the selector homeoproteins directly or indirectly regulate most genes in *Drosophila*. *Development* 125, 4471-82.

Lin, D.M. and Goodman, C.S. (1994) Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13, 507-23.

Lin, X. (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131, 6009-21.

Lin, X. and Perrimon, N. (1999) *Dally* cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* 400, 281-4.

Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J.D., Wells, D.E. and Matzuk, M.M. (2000) Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* 224, 299-311.

Lindsley, D.L., and Zimm G.G. (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

Lipshitz, H.D. and Kankel, D.R. (1985) Specificity of gene action during central nervous system development in *Drosophila melanogaster*: analysis of the lethal (1) optic ganglion reduced locus. *Dev Biol* 108, 56-77.

MacDonald, P.M., Ingham, P. and Struhl, G. (1986) Isolation, structure, and expression of *even-skipped*: a second pair-rule gene of *Drosophila* containing a homeo box. *Cell* 47, 721-34.

Marcelle, C., Ahlgren, S. and Bronner-Fraser, M. (1999) In vivo regulation of somite differentiation and proliferation by Sonic Hedgehog. *Dev Biol* 214, 277-87.

Moore, T.M., Garg, R., Johnson, C., Coptcoat, M.J., Ridley, A.J. and Morris, J.D. (2000) PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 275, 4311-22.

Morio, H., Honda, Y., Toyoda, H., Nakajima, M., Kurosawa, H. and Shirasawa, T. (2003) EXT gene family member *rib-2* is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 317-23.

Muskavitch, M.A. (1994) Delta-notch signaling and *Drosophila* cell fate choice. *Dev Biol* 166, 415-30.

Nakato, H., Futch, T.A. and Selleck, S.B. (1995) The division abnormally delayed (*dally*) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division

## Referenzen

---

patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development* 121, 3687-702.

Nishimura, I., Yang, Y. and Lu, B. (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* 116, 671-82.

Noonan, D.M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y. and Hassell, J.R. (1991) The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 266, 22939-47.

Noonan, D.M. and Hassell, J.R. (1993) Perlecan, the large low-density proteoglycan of basement membranes: structure and variant forms. *Kidney Int* 43, 53-60.

Park, Y., Fujioka, M., Jaynes, J.B. and Datta, S. (1998) *Drosophila* homeobox gene *eve* enhances *trol*, an activator of neuroblast proliferation in the larval CNS. *Dev Genet* 23, 247-57.

Park, Y., Fujioka, M., Kobayashi, M., Jaynes, J.B. and Datta, S. (2001) *even skipped* is required to produce a trans-acting signal for larval neuroblast proliferation that can be mimicked by ecdysone. *Development* 128, 1899-909.

Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M.M., Caldwell, M.C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C.J., McDermott, S. and Datta, S. (2003) *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev Biol* 253, 247-57.

Park, Y., Ng, C. and Datta, S. (2003b) Induction of *string* rescues the neuroblast proliferation defect in *trol* mutant animals. *Genesis* 36, 187-95.

Perrimon, N. and Bernfield, M. (2000) Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404, 725-8.

Perrimon, N. and Häcker, U. (2004) Wingless, hedgehog and heparan sulfate proteoglycans. *Development* 131, 2509-11; author reply 2511-3.

Perucho, M., Hanahan, D. and Wigler, M. (1980) Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell* 22, 309-17.

Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P., Benos, P.V., Gatt, M.K., Murphy, L., Harris, D., Barrell, B., Ferraz, C., Vidal, S., Brun, C., Demaille, J., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Borkova, D., Minana, B., Kafatos, F.C., Bolshakov, S., Siden-Kiamos, I., Papagiannakis, G., Spanos, L., Louis, C., Madueno, E., de Pablos, B., Modolell, J., Bucheton, A., Callister, D., Campbell, L., Henderson, N.S., McMillan, P.J., Salles, C., Tait, E., Valenti, P., Saunders, R.D., Billaud, A., Pachter, L., Klapper, R., Janning, W., Glover, D.M., Ashburner, M., Bellen, H.J., Jäckle, H. and Schafer, U. (2002) Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep* 3, 34-8.

Prokop, A. and Technau, G.M. (1991) The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* 111, 79-88.

## Referenzen

---

Prokop, A. and Technau, G.M. (1994) Normal function of the mushroom body defect gene of *Drosophila* is required for the regulation of the number and proliferation of neuroblasts. *Dev Biol* 161, 321-37.

Reynolds, C.H., Utton, M.A., Gibb, G.M., Yates, A. and Anderton, B.H. (1997) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* 68, 1736-44.

Ribeiro, C., Petit, V. and Affolter, M. (2003) Signaling systems, guided cell migration, and organogenesis: insights from genetic studies in *Drosophila*. *Dev Biol* 260, 1-8.

Robertson, H.M., Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Benz, W.K. and Engels, W.R. (1988) A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-70.

Rogalski, T.M., Williams, B.D., Mullen, G.P. and Moerman, D.G. (1993) Products of the unc-52 gene in *Caenorhabditis elegans* are homologous to the core protein of the mammalian basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Genes Dev* 7, 1471-84.

Rooke, J.E. and Xu, T. (1998) Positive and negative signals between interacting cells for establishing neural fate. *Bioessays* 20, 209-14.

Rorth, P. (1996) A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12418-22.

Rowitch, D.H., B, S.J., Lee, S.M., Flax, J.D., Snyder, E.Y. and McMahon, A.P. (1999) Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* 19, 8954-65.

Rubin, G.M. and Spradling, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-53.

Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-6.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shannon, M.P., Kaufman, T.C., Shen, M.W. and Judd, B.H. (1972) Lethality patterns and morphology of selected lethal and semi-lethal mutations in the zeste-white region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 72, 615-38.

Shulman, J.M., Benton, R. and St Johnston, D. (2000) The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101, 377-88.

Shulman, J.M. and Feany, M.B. (2003) Genetic modifiers of tauopathy in *Drosophila*. *Genetics* 165, 1233-42.

Skeath, J.B. and Thor, S. (2003) Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* 13, 8-15.

## Referenzen

---

- Spana, E.P., Kopczynski, C., Goodman, C.S. and Doe, C.Q. (1995) Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* 121, 3489-94.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A. and Ghetti, B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7737-41.
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-7.
- Spring, J., Paine-Saunders, S.E., Hynes, R.O. and Bernfield, M. (1994) *Drosophila* syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3334-8.
- Starz-Gaiano, M. and Montell, D.J. (2004) Genes that drive invasion and migration in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 14, 86-91.
- Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H. and Vorbruggen, G. (2004) Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr Biol* 14, 225-30.
- Stronach, B.E. and Perrimon, N. (1999) Stress signaling in *Drosophila*. *Oncogene* 18, 6172-82.
- Stüttem, I. and Campos-Ortega, J.A. (1991) Cell commitment and cell interactions in the ectoderm of *Drosophila melanogaster*. *Development Suppl* 2, 39-46.
- Sullivan, W., Ashburner, A., Hawley, R.S. (2000) *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbour Press. Cold Spring Harbour, New York. First edition.
- Suzanne, M., Perrimon, N. and Noselli, S. (2001) The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of the egg dorsal appendages and micropyle. *Dev Biol* 237, 282-94.
- Tabata, T., Eaton, S. and Kornberg, T.B. (1992) The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* 6, 2635-45.
- Tassan, J.P. and Le Goff, X. (2004) An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family. *Biol Cell* 96, 193-9.
- Tassi, E., Biesova, Z., Di Fiore, P.P., Gutkind, J.S. and Wong, W.T. (1999) Human JIK, a novel member of the STE20 kinase family that inhibits JNK and is negatively regulated by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 274, 33287-95.
- Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989) A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98, 81-5.
- Thomas, B.J. and Wassarman, D.A. (1999) A fly's eye view of biology. *Trends Genet* 15, 184-90.

## Referenzen

---

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.

Timm, T., Li, X.Y., Biernat, J., Jiao, J., Mandelkow, E., Vandekerckhove, J. and Mandelkow, E.M. (2003) MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. *Embo J* 22, 5090-101.

Timpl, R. (1993) Proteoglycans of basement membranes. *Experientia* 49, 417-28.

Tissot, M. and Stocker, R.F. (2000) Metamorphosis in drosophila and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Prog Neurobiol* 62, 89-111.

Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Fox, B. and Selleck, S.B. (2000) Structural analysis of glycosaminoglycans in animals bearing mutations in sugarless, sulfateless, and tout-velu. *Drosophila* homologues of vertebrate genes encoding glycosaminoglycan biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 275, 21856-61.

Truman, J.W. and Bate, M. (1988) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 125, 145-57.

Tsuda, M., Kamimura, K., Nakato, H., Archer, M., Staatz, W., Fox, B., Humphrey, M., Olson, S., Futch, T., Kaluza, V., Siegfried, E., Stam, L. and Selleck, S.B. (1999) The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 400, 276-80.

Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. and Technau, G.M. (1993) A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* 118, 765-75.

Voigt, A., Pflanz, R., Schafer, U. and Jäckle, H. (2002) Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev Dyn* 224, 403-12.

Weber, U., Paricio, N. and Mlodzik, M. (2000) Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye. *Development* 127, 3619-29.

Welshons, W.J. (1965) Analysis of a gene in *Drosophila*. *Science* 150, 1122-9.

White, K. and Kankel, D.R. (1978) Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 65, 296-321.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-80.

Wittmann, C.W., Wszolek, M.F., Shulman, J.M., Salvaterra, P.M., Lewis, J., Hutton, M. and Feany, M.B. (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293, 711-4.

Wu, C., Whiteway, M., Thomas, D.Y. and Leberer, E. (1995) Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular



## Referenzen

---

signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 15984-92.

Yoshida, H., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Cohen, P. and Goedert, M. (2004) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 90, 352-8.

## **7. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Jäckle angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Herbert Jäckle für die Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Jahn und Prof. Arnold danke ich dafür, daß sie mir als Gutachter dieser Arbeit die Möglichkeit gegeben haben, meine Promotion an der Universität Braunschweig durchzuführen.

Dank schulde ich Prof. Maniak und Herrn Rühling für die freundliche Unterstützung bei den SEM-Aufnahmen.

Ralf Pflanz, Doris Brentrup und Ulrich Schäfer haben diese Arbeit mit wertvollem Rat und wichtigen Anregungen begleitet. Reinhard Schuh, Gordon Dowe, Peter Karsten, Annette Peter, Uli Löhr, Martin Zeidler sowie die ehemaligen und gegenwärtigen Mitglieder der Abteilung, insbesondere des Labors 2, haben durch ihre Unterstützung und Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht ohne Erwähnung sollen an dieser Stelle auch Alexander Prell und Wolfgang Hase bleiben.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt Verena Willenborg, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nie zu einem Ende gefunden hätte.

## **Lebenslauf**

### **Aaron Voigt**

16.08.1972	Geburt in Hannover Eltern: Horst und Monika Voigt, geb. Ahrens
1979-1983	Besuch der Grundschule Giesen
1983-1985	Besuch der Orientierungsstufe Himmelsthür
1985-1992	Besuch des Gymnasiums Himmelsthür
1992	Abitur
1993-1996	Grundstudium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
1996	Vordiplom in Biologie in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie und Physikalischer Chemie
1996-1998	Hauptstudium in Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
1998	Diplomprüfung in Biologie in den Fächern Biochemie, Mikrobiologie und Chemie
1998-1999	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der Georg-August-Universität Göttingen
1999	Diplom in Biologie
1999-2005	Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie unter Leitung von Prof. Jäckle